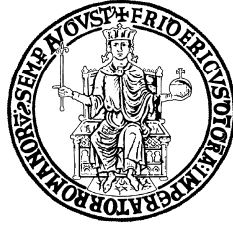


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II



FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dottorato di Ricerca in

Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale

XXII CICLO

**STUDIO SULLA PRODUZIONE DI METANO NEI
RUMINANTI: VALUTAZIONE *IN VITRO* DI ALIMENTI E
DIETE**

Tutor Chiar.^{ma} Prof.^{ssa}

Serena Calabrò

Candidato Dott.ssa

Antonietta Guglielmelli

Coordinatore

Chiar.^{ma} Prof.^{ssa} Maria Luisa Cortesi

Novembre 2009

INDICE

CAPITOLO 1.

Introduzione generale

Il gas metano: impatto ambientale e produzioni zootecniche	Pag 4
Il rumine e le fermentazioni ruminanti	Pag 9
Microbiologia ruminale	Pag 10
Biochimica della produzione di metano	Pag 11
Influenza della dieta nella produzione di metano	Pag 17
Controllo ed inibizione della metanogenesi	Pag 19
Misurazione del metano nei ruminanti: tecniche <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Pag 21
Obiettivo della tesi	Pag 23

CAPITOLO 2.

Fermentazione *in vitro* di carboidrati a diversa fermentescibilità e misurazione del metano mediante gas-cromatografia

Introduzione	Pag 25
Obiettivo della prova	Pag 29
Materiale e metodi	Pag 29
Risultati e discussione	Pag 35
Conclusioni	Pag 39

CAPITOLO 3.

Stima *in vitro* del metano in diete per ruminanti a base di soia f.e. e favino

Introduzione	Pag 49
Obiettivo della prova	Pag 51
Materiale e metodi	Pag 51
Risultati e discussione	Pag 53
Conclusioni	Pag 56

CAPITOLO 4.

Studio *in vitro* di un fieno di lupinella raccolto a diversi stadi fenologici

Introduzione	Pag 62
Obiettivo della prova	Pag 70
Materiale e metodi	Pag 71
Risultati e discussione	Pag 74
Conclusioni	Pag 78

CAPITOLO 5.

Valutazione *in vivo* di una dieta a base di Lupinella sui microrganismi del rumine

Introduzione	Pag 85
Obiettivo della prova	Pag 93
Materiale e metodi	Pag 94
Risultati e discussione	Pag 104
Conclusioni	Pag 109

CAPITOLO 6.

Effetto del PEG sulle caratteristiche *in vitro* del fieno di lupinella

Introduzione	Pag 118
Obiettivo della prova	Pag 119
Materiale e metodi	Pag 120
Risultati e discussione	Pag 122
Conclusioni	Pag 124

CAPITOLO 7.

Conclusioni generali	Pag 132
-----------------------------	---------

CAPITOLO 8.

Riferimenti bibliografici	Pag 136
----------------------------------	---------

CAPITOLO 1.

INTRODUZIONE GENERALE

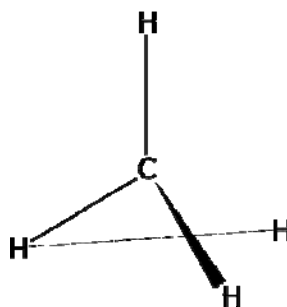
Indirizzare ogni forma di produzione agro-zootecnica verso un sistema eco-sostenibile è attualmente considerata un'importante esigenza da cui nessuna filiera di produzione dovrebbe discostarsi.

Diversamente dal passato, infatti alimentare correttamente un animale in produzione vuol dire non solo coprire adeguatamente i suoi fabbisogni in nutrienti per ottenere le performance attese, ma anche garantire il benessere animale e la sicurezza per il consumatore dei prodotti di o.a. e, sempre di più, fornire diete caratterizzate da un limitato impatto ambientale.

Il metano, considerato uno dei maggiori gas responsabili dell'effetto serra, deriva in gran parte dalle attività zootecniche e, in particolare, dall'allevamento dei ruminanti. A tale riguardo numerose sono le ricerche volte a valutare come un'adeguata manipolazione della dieta, e quindi dell'ambiente ruminale, può far ridurre le emissioni di metano di derivazione zootecnica.

Il gas metano: impatto ambientale e produzioni zootecniche

Il metano (CH_4) è un idrocarburo semplice formato da un atomo di carbonio e da quattro atomi di idrogeno; la sua molecola ha forma tetraedrica con l'atomo di carbonio al centro e gli atomi di idrogeno a vertici.



In natura si trova sotto forma di gas ed è un eccellente combustibile, poiché produce una quantità elevata di calore per massa unitaria e non contiene composti solforosi. Le emissioni di metano nell'atmosfera sono dovute sia a fonti naturali che antropogeniche (tabella 1).

Tabella 1.*Stima delle principali fonti naturali e antropogeniche del metano globale (Tg/anno)**

Naturali		Energia/Rifiuti		Agricoltura	
Paludi	115	Gas e olio	50	Risaie	60
Oceani	15	Carbone	40	Allevamenti	80
Termiti	20	Carbonella	10	Concimi	10
Incendi	10	Discariche	30	Incendi	5
		Acque reflue	25		
Totale	160		155		165

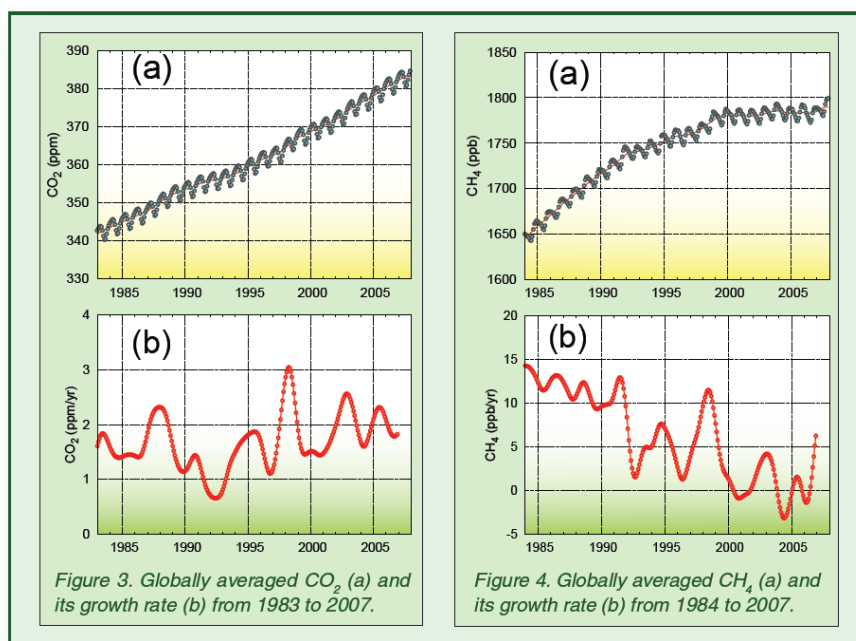
Fonte: IPCC (1992).

* tg/anno = teragrammo ($= 10^{12}$ grammo) in un anno.

Negli ultimi anni, grazie all'aumento dell'attenzione da parte della popolazione mondiale e quindi del mondo scientifico per l'inquinamento ambientale, il metano è oggi agli onori della cronaca come uno dei gas maggiormente responsabili dell'effetto serra. CO₂ e CH₄ sono i gas che in maniera più considerevole contribuiscono all'inquinamento del pianeta: il metano da solo è responsabile del 20% dell'incremento dell'effetto serra (Moss, 1993). A confronto dell'anidride carbonica, la presenza del metano in atmosfera è di molto inferiore; tuttavia, da prima della rivoluzione industriale ad oggi, la sua concentrazione ha avuto un incremento del 150%: da 700 parti per miliardo negli anni 1000-1750 a 1.788 parti per miliardo nel 2007 (Figura 1). Le sue emissioni, hanno un potenziale di riscaldamento globale ben 23 volte superiore alla CO₂ (1 tonnellata di CH₄ ha un effetto pari a 23 tonnellate di CO₂ in una scala temporale di 100 anni).

Figura 1.

Andamento delle emissioni globali di anidride carbonica e metano



Fonte: WMO, 2008

L'aumento dei livelli di metano nella troposfera sono collegati all'espansione della popolazione umana e, proporzionalmente, alle attività ad essa associate (uso di carburanti fossili, discariche, attività petrolifere, pratiche agricole) a cui va attribuita un'incidenza compresa tra il 60 e l'80%. In particolare, la quota derivante dagli allevamenti zootecnici è considerata, su scala globale, una delle più consistenti. Autori diversi riportano che il metano prodotto dai ruminanti incide con percentuali comprese tra 7.4 e 23.3% (tabella 2).

La produzione di metano ad opera dei microrganismi presenti nell'apparato digerente dei ruminanti è riconosciuta da molti anni ed è anche ben noto che la sua eliminazione rappresenta una perdita sostanziale di energia utile che si concretizza in una riduzione della produttività per l'animale e, quindi, in una perdita economica per l'allevatore. In passato, numerosi studi (Johnson e Johnson, 1995) sono stati intrapresi con l'obiettivo di quantificare le perdite di energia dovute al metano (mediamente del 6%) allo scopo di stimare correttamente l'ingestione di energia lorda e digeribile per ottimizzare le diete per gli animali in produzione al fine di esaltarne le performance.

Cicerone e Oremland, (1988) hanno dimostrato che il metano prodotto dai ruminanti è influenzato da numerosi fattori legati all'animale stesso (es. età, livello produttivo, stato fisiologico) e alle caratteristiche quanti-qualitative della dieta che viene loro somministrata. Ad esempio, una dieta più digeribile può determinare una minore produzione di metano se confrontata con una dieta di qualità inferiore; Johnson et al. (2007) riportano che con diete ricche in concentrati circa il 2% dell'energia grezza ingerita viene convertita in metano, mentre con diete a base di foraggi di bassa qualità per la produzione di metano viene perso circa il 12% dell'energia grezza ingerita.

Tabella 2.*Emissioni di metano da ecosistemi indipendenti (Tg/anno)**

Fonte	Sheppard et al (1982)	Khalil e Rasmussen (1983)	Blake (1984)	Crutzen (1985)	Seiler (1984)
Ruminanti	90	120	71 a 160	60	70 a 100
Risaie	39	95	142 a 190	120 a 200	70 a 170
Paludi	39	150	121 a 190	70 a 90	25 a 70
Oceani/laghi	65	23	18 a 34		15 a 35
Altre fonti biogeniche	817	100	60 a 397		
Biomassa	60	25	25 a 110	20 a 70	55 a 100
Gas naturali	50			33	30 a 40
Estrazione del carbone		40	62 a 100	34	35
Altre fonti non biogeniche	50				1 a 2
Totale	1210	553	500 a 1160	400	300 a 550

* tg/anno = teragrammo (= 10^{12} grammo) in un anno.

Fonte: Moss, 1993

Il rumine e le fermentazioni ruminali

Nel tratto più craniale dell'apparato digerente dei ruminanti nel corso dell'evoluzione si è verificata un'importante modificazione morfologica: lo sviluppo del rumine. In tale organo, grazie ad un'intensa attività microbica, avviene una fermentazione pre-gastrica, che in tutti gli altri animali avviene, invece, nell'intestino, in genere a livello di cieco e colon.

Le caratteristiche fisico-chimiche del rumine dipendono dalla fisiologia delle cavità pre-stomacali (reticolo, rumine, omaso) e dalle attività metaboliche delle numerose specie unicellulari (microflora e microfauna) che vi risiedono. Nel contenuto ruminale l'acqua rappresenta circa l'85-90%, la temperatura è pari a 39°C, ed è presente un ambiente anaerobio con un potenziale di ossido-riduzione che varia tra 250 e 400 mV. La produzione di gas nel rumine avviene rapidamente e la miscela è costituita principalmente da CO₂ (65%) e da CH₄ (35%), sebbene siano presenti tracce di altri gas come idrogeno, azoto e ossigeno. L'anidride carbonica è prodotta sia dalle fermentazioni microbiche che dalla neutralizzazione degli acidi per opera degli ioni bicarbonato presenti nella saliva. La composizione gassosa è tale da garantire condizioni di anaerobiosi idonee per la sopravvivenza di microrganismi strettamente anaerobi; infatti, la concentrazione di ossigeno disciolto è molto bassa (circa 0,25 µM). La risposta neurale a specifici stimoli attiva il meccanismo fisiologico dell'eruttazione che consente l'eliminazione dei gas, le contrazioni per mescolare il contenuto ruminale e il meccanismo per il rigurgito dei solidi.

Il pH varia tra 5.5 e 7.0 ed è mantenuto relativamente costante dall'azione tampone di una grande quantità di saliva contenente bicarbonato di sodio e di potassio e urea. A mantenere adeguato il valore di pH, contribuiscono anche l'assorbimento degli acidi grassi volatili (AGV) attraverso la parete ruminale e l'ammoniaca (NH₃) prodotta a seguito della degradazione proteica (Curch, 1973).

L'epitelio del rumine è semi-permeabile e selettivo al trasporto di piccole molecole verso il flusso sanguigno e viceversa. Per esempio, gli AGV sono trasportati dal rumine al sangue e gli ioni bicarbonato (HCO₃) sono trasportati nella direzione opposta.

La maggior parte degli alimenti ingeriti dai mammiferi erbivori ha un elevato contenuto in carboidrati strutturali (principali componenti della parete cellulare, in particolare cellulose ed emicellulose), i quali possono essere utilizzati dall'animale grazie all'associazione simbiotica con microrganismi capaci di degradare tali costituenti.

Questi microrganismi sono contenuti in grande quantità nel tratto del digerente dove gli alimenti voluminosi ricchi di fibra, sostano più a lungo consentendo alle fermentazioni microbiche di avere luogo.

Gli alimenti (es. erba, fieno, insilato e cereali), ingeriti dai ruminanti subiscono la prima trasformazione nella cavità orale, tramite la masticazione e la miscelazione con copiose quantità di saliva, quindi arrivano nel complesso reticolo-rumine, il quale rappresenta circa l'85% della capacità totale dei prestomaci.

Il rumine soddisfa i requisiti vitali della maggior parte dei ruminanti consentendo all'alimento di essere consumato rapidamente ma digerito lentamente. Gli alimenti fibrosi semi-digeriti possono residuare per lungo tempo nel rumine e insieme agli alimenti solidi possono essere rigurgitati e rimasticati nel periodo in cui l'animale non è impegnato a mangiare.

Nel rumine la maggior parte della comunità microbica fermenta il materiale vegetale per ricavare energia e carbonio per la propria crescita: i carboidrati vengono fermentati, i lipidi e le proteine sono idrolizzati e alcuni dei prodotti che ne derivano, vengono utilizzati dai microrganismi stessi. Gli acidi grassi a catena corta, il metano e l'anidride carbonica, insieme con il materiale microbico, rappresentano i maggiori prodotti finali della fermentazione microbica. Gli AGV vengono assorbiti attraverso la parete del rumine, vanno nel flusso sanguigno e vengono impiegati dall'animale ospite come primaria fonte di carbonio ed energia. I processi digestivi che avvengono successivamente sono simili a quelli dei monogastrici. La digestione della massa microbica fornisce ai ruminanti la maggiore frazione di aminoacidi, vitamine e minerali (Mariani e Podestà, 1996).

Microbiologia ruminale

Il rumine contiene una varia, complessa e densa popolazione di microrganismi, i quali appartengono a tre grossi gruppi: batteri, protozoi e funghi. La maggior parte dei microrganismi presenti è costituita da anaerobi obbligati che non vivono in altri ambienti, tuttavia sono presenti anche alcuni batteri anaerobi facoltativi, che possono giocare un ruolo significativo nelle reazioni che avvengono a livello di epitelio ruminale (Fallace et al., 1997). La loro capacità di eliminare l'ossigeno dal sistema, che limita la crescita degli altri anaerobi obbligati, risulta di grande importanza nell'ecologia ruminale.

Il numero dei microrganismi presenti nel rumine varia in funzione di parametri legati all'animale (anche il suo stato di salute) e alla dieta, nonché in funzione del tempo che intercorre tra la somministrazione dei vari pasti (Hungate, 1966).

Da una stima effettuata sul contenuto ruminale filtrato (che non può essere considerata rappresentativa perché molti microrganismi sono legati alla matrice solida del materiale digerito oppure si trovano a livello di epitelio) viene riportato (Mariani e Podestà, 1996) che i batteri sono mediamente presenti nell'ordine di 1×10^{10} a 1×10^{11} per ml, i protozoi ciliati da 1×10^4 a 1×10^6 per ml e i flagellati 1×10^3 a 1×10^5 per ml. Inoltre, sono stati identificate circa 200 specie di batteri e più di 20 di protozoi (Willims e Coleman, 1992).

Le diverse specie microbiche presenti nel rumine sono specializzate in funzioni metaboliche spesso limitate, ma la loro diversità permette di coprire le linee metaboliche deboli, fino a completare un'intera rete trofica.

Come riportato da Hungate (1966) è possibile classificare i batteri ruminali in base alla loro attività metabolica principale ed al substrato energetico da essi maggiormente utilizzato (Tabella 3):

- Cellulosolitici: sono in grado di idrolizzare la cellulosa e le emicellulose, rendendone disponibili i residui monosaccaridici per le fermentazioni intraruminali.
- Amilolitici: idrolizzano l'amido.
- Produttori di acido: producono acido acetico, propionico e butirrico.
- Metanogeni: producono metano.
- Lipolitici: idrolizzano i trigliceridi formando glicerolo ed acidi grassi liberi.
- Proteolitici: idrolizzano i legami peptidici delle proteine fornendo amminoacidi liberi.
- Produttori di vitamine: sintetizzano la vitamina K e vitamine del gruppo B.

Biochimica della produzione di metano

L'energia per la crescita microbica in ambienti anaerobi deriva dall'ossidazione dei substrati, implicando il trasferimento di elettroni (e protoni) ad accettori finali diversi dall'ossigeno molecolare e spesso derivati dagli stessi substrati. Nel rumine i principali prodotti che ne derivano sono gli acidi grassi volatili ed il metano. L'energia chimica

ancora disponibile nel metano può essere liberata da un'ossidazione, con il trasferimento degli equivalenti riducenti all'O₂.

Tabella 3.

Principali batteri ruminanti, substrati da essi impiegati e loro cataboliti

NOME	SUBSTRATO	CATABOLITI
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Cellulosa, xilani	Acetato, succinato, formiato
<i>Ruminococcus albus</i>	Cellobiosio, xilani	Acetato, CO ₂ , H ₂ , etanolo
<i>Streptococcus bovis</i>	Amido, glucosio	Lattato
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Lattato, glucosio	Acetato, propinato, butirrato
<i>Bacterioides succinogenes</i>	Cellulosa, amido, glucosio	Acetato, succinato, formiato
<i>Bacterioides rumini cola</i>	Glucosio	Acetato, succinato, formiato
<i>Propionibacter</i>	Lattato	Acetato, propinato, butirrato
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Succinato	Propinato
<i>Methanobacter ruminantium</i>	Formiato, CO ₂	Metano

Fonte: Hungate, 1966.

La produzione e l'eliminazione del metano dunque se da un lato concorre a mantenere condizioni ossidative in un ambiente anaerobio attraverso la riossidazione dei cofattori trasportatori di elettroni, come il NADH, il FADH₂ e la ferredossina, dall'altro rappresenta una perdita di energia per il ruminante. Czerkawski (1988) riporta che fino al 10–14% dell'energia presente negli alimenti ingeriti può essere dispersa nell'ambiente in forma di metano, che viene allontanato dall'organismo con eruttazione e flatulenze. La formazione autotrofa di metano è accompagnata dalla produzione di ATP, ma con un rendimento *in vivo* inferiore al rendimento teorico calcolabile in base ai valori di energia libera standard.

I responsabili della metanogenesi sono degli archeobatteri altamente specializzati, che rappresentano un gruppo di microrganismi unico dal punto di vista filogenetico e sono caratterizzati da uno sviluppo piuttosto lento e da una stretta anaerobiosi (per una descrizione più dettagliata di questi microrganismi si rimanda al contributo 5). I metanogeni sono presenti nell'ecosistema ruminale e rappresentano uno dei passaggi conclusivi della catena di degradazione dell'alimento, di cui sono responsabili tre differenti gruppi di microrganismi:

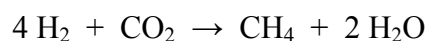
- 1° stadio – degradazione dei polisaccaridi vegetali: è dovuto all'azione di batteri che idrolizzano la cellulosa, le emicellulose, le pectine, l'amido ed altri polimeri

di carboidrati a monosaccaridi ed oligosaccaridi, i quali sono successivamente metabolizzati ad acidi grassi volatili, idrogeno, anidride carbonica e alcoli;

- 2° stadio – produzione di idrogeno molecolare: ne sono responsabili i batteri acetogenici (produttori di idrogeno, che degradano i prodotti ottenuti nel primo stadio in acido acetico, idrogeno ed in alcuni casi in anidride carbonica), i protozoi e i miceti che possiedono gli idrogenosomi.
- 3° stadio – metanogenesi: i batteri metanogeni utilizzano i prodotti ottenuti nei primi due stadi, soprattutto idrogeno e anidride carbonica, per la produzione di metano.

I tre stadi della fermentazione risultano strettamente collegati tra di loro, tanto che l'efficienza metabolica di un gruppo dipende da quella degli altri due. Gli zuccheri semplici derivati dalla degradazione dei polisaccaridi, attraverso la via della glicolisi, sono trasformati in piruvato. Il piruvato occupa una posizione chiave da cui prende avvio una serie di reazioni chimiche che differiscono sia per le specie batteriche anaerobiche coinvolte sia per le differenti condizioni ambientali di crescita delle popolazioni ruminanti. Il piruvato può essere metabolizzato ad acetato, anidride carbonica, idrogeno, oppure a butirrato o etanolo o ancora a propionato tramite lattato e succinato. Parte del propionato, degli acidi grassi a catena lunga e degli acidi aromatici vengono ossidati anaerobicamente fino ad acetato oppure ad acetato e anidride carbonica, o formiato, a seconda dei diversi substrati.

I batteri metanogeni utilizzano come substrato per la sintesi del metano principalmente l'idrogeno molecolare e l'anidride carbonica, secondo la seguente equazione:



Essi, tuttavia, sono anche in grado di utilizzare formiato ed altri precursori di minore importanza, come ad esempio l'acetato e gli alcoli primari a catena corta, fra cui il metanolo che si forma nella degradazione delle pectine, e l'n-butanolo. Il formiato può essere utilizzato dai batteri metanogeni direttamente o previa degradazione ad anidride carbonica ed idrogeno da parte di altri batteri. *In vitro*, gli alcoli primari di basso peso molecolare (fino all'n-butanolo) e soprattutto il metanolo, possono essere efficienti donatori di elettroni nella metanogenesi, ma *in vivo*, mano a mano che la digestione della pectina procede, il metanolo tende piuttosto ad accumularsi e l'etanolo a donare i propri elettroni nella sintesi di acidi grassi volatili. Il *Methanobacterium suboxidans*

ossida il butirrato ad acetato in presenza di anidride carbonica e idrogeno molecolare, formando contestualmente CH₄:



I batteri metanogeni possiedono tre coenzimi caratteristici coinvolti nelle reazioni di ossido-riduzione che si concludono con la produzione di metano:

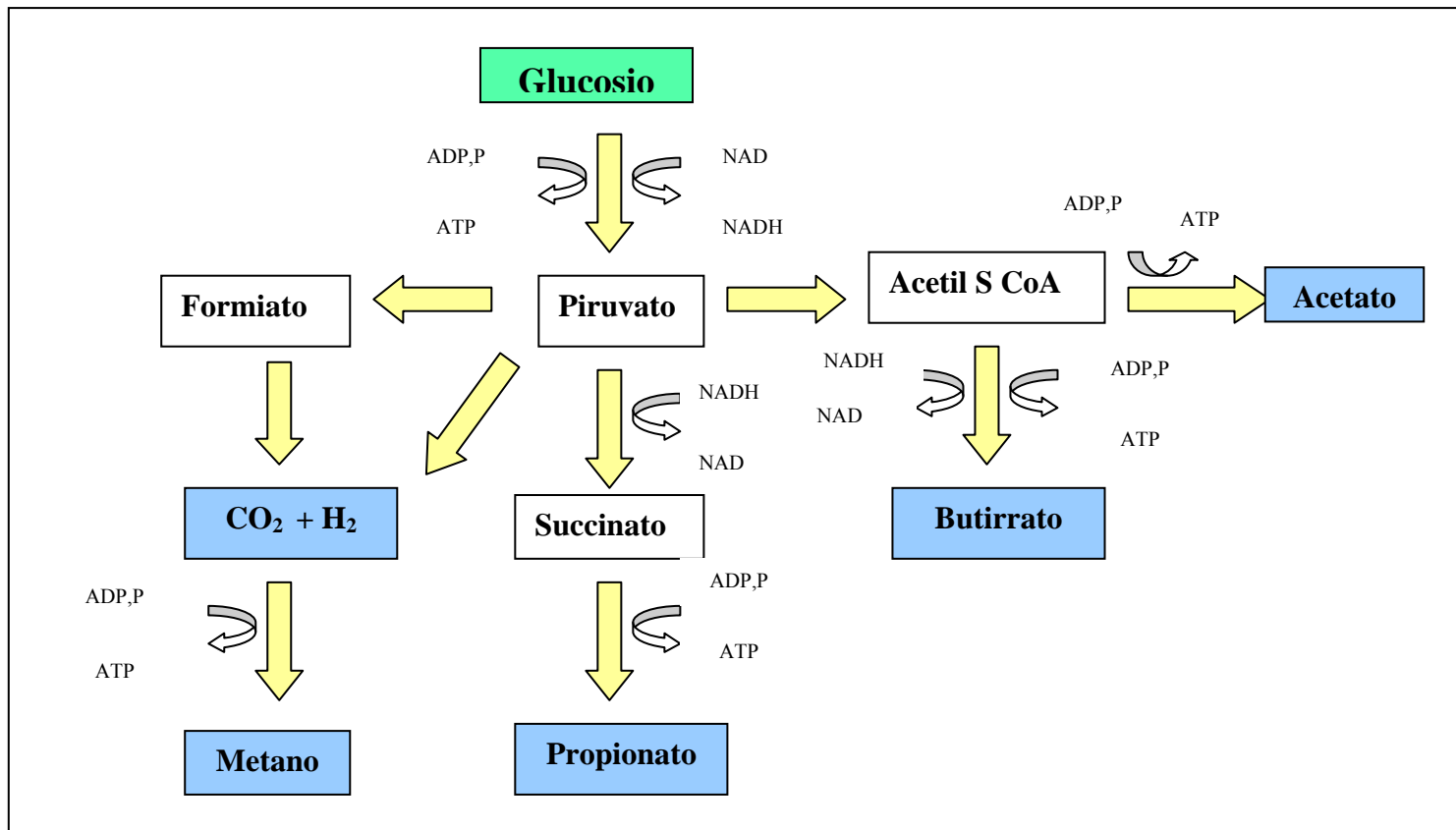
- il coenzima F₄₂₀, che partecipa come trasportatore di elettroni nel sistema NAD-idrogenasi e nel sistema formiato-deidrogenasi;
- il coenzima M (acido-2-mercato-etansolfonico), che è presente nelle reazioni di trasferimento del metile nei metanobatteri;
- il fattore B, un coenzima stabile al calore, di basso peso molecolare, coinvolto nella formazione enzimatica di metano da metil-coenzima M.

In condizioni standard, il trasferimento di elettroni dal NADH all'idrogeno molecolare è sfavorito. Calcoli stechiometrici (Czerkawski, 1988) indicano, invece, che nel rumine il processo avviene se la concentrazione di idrogeno è bassa. A pressioni parziali di idrogeno più elevate, il flusso di elettroni è invertito: non solo gli equivalenti riducenti del NADH non possono essere ceduti all'idrogeno, ma nuovo NADH si forma dall'ossidazione dell'idrogeno. Questi elettroni saranno utilizzati allora per la produzione di lattato, propionato, butirrato, formiato, etanolo, succinato, ovvero altri composti che svolgendo la funzione di accettori di equivalenti riducenti, consentono la ri-ossidazione del NADH a NAD⁺ e, di conseguenza, la prosecuzione delle reazioni ossidative in ambiente anaerobio (Figura 2). La produzione di idrogeno nel rumine avviene ad opera degli idrogenosomi, i quali consentono di eliminare parte dei protoni derivanti dalla dissociazione dei composti acidi che si formano nel corso delle fermentazioni. L'idrogeno, a sua volta viene allontanato tramite l'eruttazione oppure proprio grazie alla formazione del metano.

Queste considerazioni offrono una base per comprendere come la produzione di metano rappresenta una fonte di dissipazione energetica per l'animale. Non solo il metano non è utilizzabile per il metabolismo dell'animale ospite, ma la metanogenesi e la produzione di acidi grassi volatili sono antagoniste. Ad esempio, è stato osservato che la metanogenesi viene depressa con diete a base di concentrati, nelle quali è favorito lo sviluppo batterico a scapito di quello protozario ed avviene una maggiore produzione di propionato.

Figura 2.

Principali prodotti finali di fermentazione dei carboidrati nel rumine



Fonte: Hungate, 1966.

Le diverse specie di batteri, protozoi e funghi, hanno evoluto differenti strategie per ri-ossidare l'NADH. Alcune specie seguono vie metaboliche dove l'idrogeno derivante dal NADH viene usato per formare butirrato dal piruvato, mentre altre sintetizzano propionato dal piruvato e dal NADH (Miller, 1991). Nel rumine, a basse pressioni parziali di idrogeno, l'NADH viene ri-ossidato a NAD^+ e H_2 . I batteri metanogeni e altri accettori di idrogeno sono capaci di mantenere la pressione parziale dell'idrogeno a livelli bassi. Questo significa che la pressione parziale dell'idrogeno dipende dalla disponibilità dei metanogeni ma anche dagli altri sistemi di rimozione. Se i metanogeni sono assenti o in numero ridotto l'NADH sarà rigenerato attraverso altri sistemi di utilizzo dell'idrogeno, come la fermentazione del lattato, dell'etanolo o del succinato, che vengono poi convertiti in propionato. Di conseguenza, le proporzioni tra i diversi acidi grassi volatili prodotti dipendono anche dall'attività dei metanogeni e dalla loro interazione con l'NADH prodotto (McAllister e Newbold, 2008).

Risulta quindi chiaro che non sono i protozoi o i batteri che fermentando i carboidrati producono metano, ma molti di essi forniscono alcuni prodotti di fermentazione utili alla formazione del metano stesso (es. formiato, idrogeno e anidride carbonica). Il formiato prodotto durante la fermentazione degli zuccheri rappresenta il substrato impiegato per il 18% in produzione di metano nel rumine (Hungate et al., 1970). L'idrogeno è il principale substrato per la metanogenesi ruminale. Esso può essere diminuito mediante la riduzione dei prodotti di fermentazione (es. lattato ed etanolo) o attraverso la formazione dell'idrogeno gassoso.

Czerkawski et al. (1972) in un'indagine condotta sui batteri ruminali, ha dimostrato che il metano prodotto è inversamente proporzionale alla concentrazione di idrogeno aggiunto in fase gassosa.

I batteri metanogeni mantengono bassa la pressione parziale dell'idrogeno all'interno del rumine grazie alla loro capacità di usare l'idrogeno per trasformare l'anidride carbonica in metano. Tale processo ha un effetto significativo anche sulla formazione degli altri prodotti da parte della popolazione non metanogenica del rumine. Moomaw e Hungate (1983), studiando i processi fermentativi del *Ruminococcus albus*, hanno osservato che tale microrganismo fermenta il glucosio attraverso la via di Embden-Meyerhof-Parnas, ottenendo la formazione di piruvato in una reazione ferredossina dipendente producendo così idrogeno e anidride carbonica con acetil coenzima A.

La conseguenza della bassa pressione parziale di idrogeno ad opera dei metanogeni causa un aumento della produzione totale di idrogeno e di acetato attraverso l'attività

del *R. albus*. Questo processo è conosciuto come trasferimento di idrogeno interspecie. Il vantaggio della maggiore produzione di acetato è dato dalla maggiore produzione di ATP per il *R. albus* e il trasferimento dell'idrogeno interspecie provvede a dare più idrogeno ai metanogeni, che ne guadagnano in energia e producono più metano.

Il trasferimento dell'idrogeno interspecie influenza le caratteristiche di fermentazione di altre specie batteriche, come il *Ruminococcus flavefaciens* e il *Selemonas ruminantium*. ha un ruolo importante nella produzione degli AGV, in particolare del propionato. Questo batterio, infatti, quando cresce da solo, fermenta i carboidrati (glucosio e lattato) ad acetato, propionato, butirrato ed anidride carbonica producendo solo tracce di idrogeno. Quando invece è coltivato insieme con il *Methanobacterium ruminantium*, ci sono cambiamenti nei prodotti di fermentazione come un significativo decremento nella formazione di propionato e un aumento in quella di acetato. Questa variazione nel tipo dei prodotti di fermentazione, come risultato del trasferimento di idrogeno tra le diverse specie, probabilmente gioca un ruolo nella regolazione delle relative quantità di AGV che si formano nel rumine. La composizione degli AGV che si formano con una dieta ricca di polisaccaridi, può essere influenzata da un cambiamento nella popolazione microbica; di conseguenza, vengono modificate anche le quantità di metano prodotto.

Influenza della dieta sulla produzione di metano

L'eruttazione del metano da parte dei bovini comincia quando le particelle solide di alimento vengono trattenute nel complesso rumine-reticolo (Anderson et al., 1987). È stato stimato che annualmente la produzione di metano in un manzo varia dai 60 ai 71 kg, mentre in una vacca in lattazione tra i 109 e i 126 kg (EPA, 1993). L'energia persa con il metano varia dal 2 al 12% dell'energia grezza ingerita (Johnson et al., 1993). Generalmente, tale variabilità aumenta con la digeribilità della dieta; razioni con un alto livello di digeribilità, determinano minore produzione di metano.

I principali meccanismi responsabili di tale effetto sono due: il primo è legato alla quantità di carboidrati della dieta che fermentano nel reticolo-rumine ed è influenzato dal bilancio tra la quota di carboidrati fermentati e la velocità di passaggio. Il secondo meccanismo regola la disponibilità di idrogeno e la conseguente produzione di metano dagli AGV. Principalmente è il rapporto tra acetico e propionico ad avere un maggior peso sulla produzione di metano; generalmente il rapporto acetato/propionato è compreso tra 0.9 e 4. Per un valore pari a 0.5, l'energia lorda persa come metano sarebbe uguale allo 0%. D'altra parte, se tutti i carboidrati fossero fermentati come

acetato e non fosse prodotto propionato, l'energia persa come metano sarebbe del 33% (Wolin e Miller, 1988). Inoltre, se pur di minore importanza, la produzione di metano può essere influenzata anche da meccanismi alternativi che riciclano l'idrogeno, come per esempio la crescita microbica, la produzione di acidi grassi insaturi, di nitrati e di solfati (Johnson e Jonshon, 1995).

Diversi fattori possono, quindi, intervenire nella regolazione della produzione di metano: l'ingestione di alimento, il tipo di carboidrati ingeriti, i foraggi somministrati, l'aggiunta di lipidi alla razione, la manipolazione della microflora.

Il tipo di carboidrati fermentati influenza la produzione di metano principalmente attraverso l'impatto che essi hanno sul pH ruminale e sulla popolazione microbica. La fermentazione dei carboidrati della parete cellulare produce più acetato rispetto al propionato e quindi più metano (Moe e Tyrrell, 1979). La fermentazione dei carboidrati solubili, produce meno metano rispetto ai carboidrati di struttura; i componenti non appartenenti alla parete cellulare, es. zuccheri solubili, sono meno metanogenici dell'amido. Indipendentemente dalla frazione di carboidrati fermentati, il metano prodotto diminuisce aumentando la quantità di sostanza organica fermentata.

In uno studio *in vivo* Moe e Tyrrell (1979) trovano una relazione tra la composizione della dieta e la sua ingestione e la produzione di metano in vacche in lattazione. Gli autori riportano che, al di fuori di un certo *range* di ingestione (da 20.7 a 22.93 kg S.S./giorno) la produzione di metano per grammo di cellulosa digerita era pari a tre volte quella delle emicellulose e a cinque volte quella della frazione solubile (grammo di digerito). Questo risultato suggerisce che le differenze tra i diversi carboidrati sono dovute sostanzialmente ad una più bassa proporzione della frazione solubile fermentata nel rumine ed una più ampia porzione digerita e assorbita come glucosio nel piccolo intestino. In una sperimentazione *in vitro* impiegando 26 fonti di carboidrati solubili Czerkawski e Breckenridge (1969) hanno evidenziato che la quantità di metano prodotto varia con la quantità di carboidrati fermentati ma non con il tipo di carboidrati. Altre indagini *in vivo* hanno mostrato come la produzione di metano varia con la natura dei carboidrati digeriti, ma questo effetto è meno importante con livelli di ingestione bassi, piuttosto che alti (Moe e Tyrrell, 1979).

Blaxter e Wainman (1964) riportano che diete formulate per ovini e caprini con differenti proporzioni di fieno e farina di mais, producono quantità diverse di metano, che aumenta all'aumentare della quota di foraggio.

Thomson e Lamming (1972) hanno registrato una maggiore produzione di metano in una dieta a base di cereali combinata con un fieno grossolano; gli autori spiegano che questo risultato è dovuto al fatto che la presenza di particelle più grossolane nel rumine aumenta la velocità di passaggio di quelle più piccole. Di conseguenza, in presenza di fibra lunga l'amido lascia il rumine più rapidamente garantendo condizioni ruminali più stabili in termini di pH e favorendo la produzione di acetato a scapito del propionato.

Diete di alta qualità e ricche in concentrati non solo favoriscono una maggiore ingestione di sostanza secca e quindi aumentano le performance, ma producono meno metano e, quindi, consentono una più efficiente utilizzazione dell'energia.

L'impiego di foraggi macinati e pellettati può diminuire in modo marcato la metanogenesi, in quanto viene aumentata la loro velocità del passaggio nel rumine (Blaxter, 1989).

Anche la degradazione delle proteine (Schwartz e Gilchrist, 1975) contribuisce all'aumento del metano prodotto; quando la disponibilità di azoto nel rumine è limitata anche la produzione di metano è più contenuta in quanto l'azoto è un fattore limitante le specie batteriche, in particolare i cellulolitici e quelli che producono metano.

Anche l'aggiunta di grassi nella dieta influenza la metanogenesi grazie a diversi meccanismi di regolazione, quali la bio-idrogenazione degli acidi grassi insaturi, l'intensificazione della produzione di propionato e l'inibizione della crescita dei protozoi (Johnson e Johnson, 1995).

Controllo ed inibizione della metanogenesi

Come già detto, la metanogenesi comporta una perdita di energia presente nell'alimento; per ridurre la produzione di metano teoricamente è ipotizzabile un aumento del propionato che comporterebbe un aumento dell'efficienza energetica della dieta.

Diversi studi sono stati finalizzati alla ricerca di agenti chimici che possano modulare le fermentazioni in modo da migliorare l'efficienza di utilizzazione dell'alimento.

Gli additivi chimici impiegati a tale scopo possono essere suddivisi in due gruppi. Il principio su cui si basa il funzionamento del primo è quello di sottrarre l'idrogeno disponibile per la metanogenesi mediante un'inibizione competitiva, per esempio aumentando gli acidi grassi insaturi (Czerkaswski et al., 1966), i solfati e i nitrati. I composti dell'altro gruppo sono invece specificamente tossici per i metano-batteri.

Composti ionofori

I composti ionofori sono costituiti da molecole con particolari strutture contenenti atomi di ossigeno strategicamente spazati, che consentono modificazioni di conformazione tali da facilitare lo scambio di cationi attraverso le membrane batteriche (Pressman, 1976). Questi additivi chimici, specialmente il monesin ed il lasalacid, hanno avuto un notevole successo nel miglioramento delle performance animali.

L'aggiunta di monensin, l'antibiotico ionoforo maggiormente studiato, alla razione alimentare determina un aumento della produzione del propionato a scapito di quella dell'acetato e del butirrato ed una parziale riduzione della metanogenesi senza accumulo dell'idrogeno. Ciò a causa della diversa sensibilità agli effetti dell'antibiotico da parte delle diverse specie unicellulari presenti nel rumine. Studi *in vitro* (Bergen e Bates, 1984) hanno documentato che questo antibiotico inibisce vari ceppi batterici che producono lattato, batteri formanti acido formico e quelli che favoriscono la produzione di idrogeno. La riduzione della produzione di metano con il monensin va dal 4 al 31%.

È stato osservato che con razioni ad alto contenuto di carboidrati, il monesin *in vitro* induce un significativo abbassamento del lattato e un aumento del pH, mentre *in vivo* può avere effetti positivi nel contrastare l'acidosi lattica. Il numero di protozoi ruminali in bovini e ovini al pascolo si riduce del 4-60% con aggiunta di monensin (Martin e Macy, 1985).

Tuttavia, gli antibiotici ionofori possono ridurre la quantità di alimento assunto giornalmente. Inoltre, riducono il fabbisogno proteico diminuendo l'ossidazione degli aminoacidi che si sono liberati nel rumine per idrolisi dei legami peptidici e diminuiscono la degradazione ruminale delle proteine alimentari.

Il monensin, trattandosi di un promotore di crescita che comporta effetti non trascurabili per la salute dei consumatori, l'utilizzo è stato vietato nella Comunità Europea a partire dal 1 gennaio 2006 (Reg. CEE n. 1831/2003).

Composti alogenati

Sono potenti inibitori della metanogenesi e di solito la loro attività varia in base al numero e al tipo di alogeni presenti nella molecola, per esempio composti a base di iodio hanno più effetto rispetto a composti a base di bromo, che a loro volta sono più efficaci di quelli a base di cloro.

È stato osservato che tali composti possono aumentare *in vitro* la produzione di propionato e butirrato a spese dell'acetato; la produzione di metano si riduce fino al

70% sebbene viene accumulata una parte di idrogeno. Questo indica che il meccanismo d'azione dei composti alogenati risulta selettivamente tossico verso i metanogeni (Prins, 1978). Resta soltanto da valutare quanto sia persistente l'effetto di inibizione e, quindi, la tossicità di tali composti a lungo termine sulle specie microbiche ruminali e quindi sull'ospite e sul consumatore finale.

Altri agenti chimici

Czerkasky et al. (1966) hanno dimostrato una considerevole inibizione della metanogenesi anche utilizzando acidi grassi insaturi, come inibitori competitivi, e composti a base di ioni solfato (Demeyer e Van Nevel, 1975).

Contemporanei trattamenti con agenti chimici diversi possono essere complementari nella riduzione della metanogenesi e nel miglioramento dell'ingestione di alimento.

Conseguenze del controllo chimico

Quando vengono utilizzati dei composti chimici per inibire la metanogenesi, è ovvio che esistono una complessità di effetti da considerare. Per esempio, i cellulolitici e le loro fermentazioni possono essere depresse, i protozoi inibiti e, in alcuni casi, anche la proteolisi ridotta con un accumulo di idrogeno. Tale effetto può, quindi, diminuire la crescita microbica e alterare l'energia ottenuta dalle proteine. L'importanza di questi fattori dipende strettamente dal tipo di dieta. L'inibizione della metanogenesi è relativamente semplice da ottenere, ma gli effetti che vi si accompagnano possono impedire i risultati positivi di tale inibizione.

Un altro problema associato al controllo del metabolismo ruminale con agenti chimici è il potenziale rischio di accumulo di tali composti, o dei loro metaboliti, nei prodotti animali con ricadute negative per l'uomo e per l'ambiente.

Per questo motivo, la soluzione ideale per ottenere effetti positivi, sarebbe quella di utilizzare sostanze naturali, o semplicemente manipolare la dieta. Armstrong e Gilbert (1985) suggeriscono anche che le tecniche del DNA ricombinante potrebbero essere impiegate per modificare le caratteristiche di fermentazione dei microrganismi ruminali.

Misurazione del metano nei ruminanti: tecniche *in vivo* e *in vitro*

Al fine di valutare le emissioni di metano sono stati sviluppati diversi metodi di misurazione della composizione dei gas prodotti dai ruminanti. Queste tecniche hanno tutte l'obiettivo comune di analizzare il gas raccolto nel più breve tempo possibile.

Il metano può essere misurato utilizzando diverse tecniche di quantificazione:

- spettrofotometria ad infrarossi;
- bilancio termo-gravimetrico (TGA);
- spettroscopia di massa;
- sistema di telerilevamento ottico basato su laser (TDL);
- gas cromatografia (GC).

Le tecniche ad infrarossi misurano il metano in quantità comprese nell'intervallo che va dai 0 ai 500 ppm, sebbene diversi accorgimenti tecnici possono permettere di aumentare questo intervallo.

La spettroscopia di massa è una tecnica di analisi molto rapida e consente di determinare diversi gas contemporaneamente, inoltre permette misurazioni accurate e stabili per un ampio *range* di concentrazioni, i costi eccessivi, però, ne scoraggiano l'utilizzo. Costi troppo elevati sono anche la causa per cui anche il sistema di telerilevamento ottico, basato su laser, viene impiegato raramente per la misurazione del metano di origine ruminale (Harper et al., 1993).

La tecnica più usata tra quelle citate risulta, quindi, essere la gas cromatografia, perché, se pur meno sensibile delle altre, consente una valutazione sufficientemente precisa del campione di gas, oltre a permettere un notevole risparmio in termini economici. Per ulteriori dettagli riguardanti la misurazione del metano mediante GC, si rimanda al contributo 2 di questa tesi.

Il metodo di campionamento del gas va scelto in base agli obiettivi che ci si propone nella sperimentazione, e in relazione al tipo di studio da condurre, se si tratta ad esempio di studi *in vivo* o *in vitro*.

Per la determinazioni sui singoli animali possiamo distinguere: le tecniche *enclosure*, le tecniche *tracer* o le equazioni predittive. Tra le prime possiamo citare le camere respiratorie, le scatole che circondano la testa dell'animale o le maschere; tutte consentono di raccogliere e analizzare l'aria inspirata ed espirata dall'animale (McLean e Tobin, 1987). Le camere respiratorie possono contenere l'intero animale, e hanno il vantaggio di effettuare una efficace valutazione di tutte le emissioni (eruttazione e flatulenze), ma d'altra parte risultano svenienti per i costi di gestione e per i limitati movimenti dell'animale. Per questo motivo sono stati messi a punto dei sistemi che circondano solo la testa dell'animale (box e cappucci) che consentono una maggiore libertà di movimento; ovviamente in questi casi risulta impossibile valutare le emissioni

intestinali; inoltre, nel caso delle maschere gli svantaggi sono legati anche al bisogno di un'assistenza che consenta all'animale di mangiare e bere. Tutti i metodi sopracitati sottostimano le emissioni del 9 % (Liang et al., 1989).

Tra le tecniche *tracer* distinguiamo quelle isotopiche e non isotopiche. Le prime prevedono l'utilizzo di animali provvisti di fistola ruminale, l'infusione di traccianti (^3H -metano o ^{14}C -metano) all'interno del rumine e la successiva valutazione del gas in uscita (Murray et al., 1975).

Per le tecniche non isotopiche vengono usati gas inerti come l'esafluoruro di zolfo (SF_6): un tubo permeabile all'interno del rumine rilascia una quantità nota di gas che viene poi raccolto attraverso un tubo capillare e un recipiente collegati alla testa dell'animale (Johnson et al., 1994). Successivamente i campioni raccolti vengono analizzati mediante gas-cromatografia. I metodi di incubazione *in vitro*, consentono di riprodurre le situazioni sperimentali del vivo, e se pur con i limiti legati alla metodica stessa (es. il sistema è chiuso), permettono di determinare la produzione di metano in modo veloce ed economico (es. studiando più alimenti contemporaneamente) evitando anche tutti gli inconvenienti legati alla gestione e, quindi, al benessere dell'animale.

Obiettivo della tesi

Lo scopo generale di questa tesi è quello di studiare come il metano prodotto ad opera delle fermentazioni dei microrganismi ruminali può essere influenzato da vari fattori della dieta, come il tipo di carboidrati, la fonte proteica o la presenza di fattori antinutrizionali. In particolare, il metano è stato determinato (mediante gas-cromatografia e, in un contributo, con un metodo chimico) al termine dell'incubazione *in vitro* dei substrati, utilizzando liquido ruminale tamponato, seguendo il protocollo della tecnica della produzione cumulativa di gas.

Si riporta di seguito una breve sintesi dei vari contributi sperimentali.

Nel capitolo 2 è stata effettuata una sperimentazione *in vitro*, impiegando la tecnica della produzione di gas, per studiare: le caratteristiche di fermentazione (produzione di gas e degradabilità della sostanza organica), la cinetica (velocità e tempo in cui essa viene raggiunta) e i prodotti finali (acidi grassi volatili, metano) di diverse materie prime, fonti di carboidrati a diversa fermentescibilità ruminale, che vengono utilizzati nella formulazione di diete per ruminanti.

Nel capitolo 3, il metano prodotto a seguito di fermentazioni *in vitro* di diete a diverso rapporto energia/azoto è stato determinato impiegando un metodo chimico che si basa sul principio della solubilità dell'anidride carbonica nell'idrossido di sodio.

Oggetto di studio del capitolo 4 è stato un fieno di lupinella, leguminosa ricca in tannini condensati. Il fieno è stato raccolto a quattro stadi fenologici diversi e sono state analizzate le caratteristiche di fermentazione e determinata la produzione di metano in gascromatografia.

Nel capitolo 5 sono riportati i risultati di uno studio effettuato *in vivo* su bovine alimentate con diete a base di lupinella per 50 giorni. Questa sperimentazione è stata realizzata a Wageningen (Paesi Bassi) in collaborazione con il Gruppo di Animal Nutrition della Wageningen University. In particolare, per valutare i cambiamenti che avvengono sui microrganismi ruminali responsabili della metanogenesi, a seguito della presenza di tannini, è stata effettuata la quantificazione dei metanogeni mediante qPCR e la conta dei protozoi.

Il PEG, noto composto con effetto inibitorio sui tannini, è stato impiegato, nel contributo 6, per studiare alcune caratteristiche di fermentazione *in vitro* incubando un fieno di lupinella e un fieno di Erba medica.

CAPITOLO 2.

Fermentazione *in vitro* di carboidrati a diversa fermentescibilità e misurazione del metano mediante gas-cromatografia

INTRODUZIONE

La produzione di metano nel rumine riduce l'efficienza di utilizzazione energetica degli alimenti da parte dei ruminanti e contribuisce all'effetto serra. Molti fattori influiscono sulla produzione di metano nel rumine, dipendenti dalla dieta – rapporto foraggi:concentrato, qualità del foraggio, tipo di carboidrati, trattamenti sugli alimenti – (Moe e Tyrrell, 1979; Crutzen et al., 1986; Birkelo et al., 1986), e quindi dalle variazioni microbiche a livello ruminale (es. numero di protozoi, numero e tipo di metanogeni; Makkar e Vercoe, 2007) o dipendenti dall'animale (es. ingestione di alimento, digeribilità, specie, stato fisiologico (Lee et al., 2003). Già nel 1965 Blaxter e Clapperton riportavano che l'aumento dei concentrati nella razione riduce la percentuale di energia persa per la conversione in metano e ciò è dovuto principalmente alla quantità di amido che favorisce le fermentazioni di tipo propionico; d'altra parte diete ricche in foraggi provocano una fermentazione di tipo acetica, e quindi una maggiore produzione di metano.

L'inserimento di dati relativi al metano nei programmi di razionamento potrebbe rappresentare un utile strumento per effettuare un razionamento equilibrato della vacca da latte, volto, tra le altre cose, alla riduzione delle emissioni di metano

I risultati confrontabili tra tecniche *in vivo* e tecniche *in vitro*, suggeriscono che queste ultime riflettono in maniera accettabile le condizioni *in vivo* e quindi costituiscono un valido metodo per esaminare le strategie per influenzare le emissioni di metano.

Le fermentazioni ruminali *in vitro* possono essere impiegate per ottenere dati riguardanti la produzione di CH₄ da vari alimenti, tuttavia Frumholtz et al. (1989)

riportano che, a causa della perdita di protozoi e metanogeni, la produzione di metano *in vitro* è pari a circa un quinto di quella ottenuta *in vivo*.

Misurazione del metano nei ruminanti: la gas cromatografia

Il metano prodotto dai batteri del rumine può essere determinato direttamente *in vivo* (Johnson et al., 2007) sugli animali, stimato mediante opportuni calcoli stechiometrici a partire dagli acidi grassi volatili prodotti (Rossi et al., 2001) o determinato, mediante gas-cromatografia o con metodi chimici, alla fine di fermentazioni *in vitro* (Lee et al., 2003).

La determinazione del metano mediante gas-cromatografia consente una valutazione sufficientemente precisa e rapida, inoltre permette un notevole risparmio in termini economici se confrontata alle altre metodiche (es. spettrofotometria ad infrarossi; bilancio termo-gravimetrico; spettroscopia di massa; sistema di telerilevamento ottico basato su laser). La misurazione del metano, come anche di altri gas di fermentazione, segue quattro tappe obbligate:

- a) misura del gas totale
- b) campionamento del gas
- c) analisi della composizione del gas
- d) calcolo.

a) Misura del gas totale

Esistono diversi modi per misurare il gas totale prodotto dalle fermentazioni batteriche, in tutti i casi è importante che il sistema sia in grado di accumulare gas durante il processo di fermentazione. Uno di questi metodi consiste nel misurare il gas alla fine dell'incubazione *in vitro* di alimenti da testare con liquido ruminale tamponato seguendo il protocollo della tecnica della produzione cumulativa di gas descritta da Theodorou et al., (1994). Questo sistema, che si è affermato negli ultimi anni, è stato messo a punto per stimare il valore nutritivo dei foraggi e si basa sul presupposto che la fermentazione anaerobica dei carboidrati da parte dei microrganismi ruminali produce acidi grassi volatili, anidride carbonica, metano e tracce di H₂; quindi la misurazione della produzione di gas durante la fermentazione *in vitro* degli alimenti in condizioni di anaerobiosi con un opportuno inoculo può essere usata per studiare la velocità e l'entità del processo fermentativo.

b) Campionamento del gas

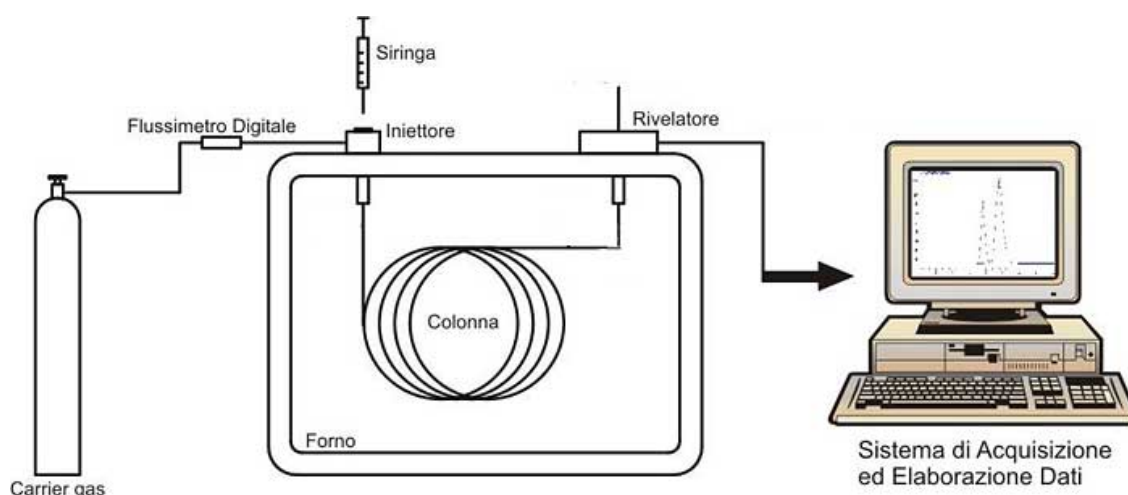
Un campione rappresentativo del gas prodotto deve essere prelevato in modo opportuno; generalmente questa operazione viene eseguita utilizzando una siringa in vetro a tenuta, munita di un sistema (valvola o rubinetto) che consente di chiuderne l'uscita, una volta prelevato il gas e conservare il campione al suo interno. Il campione di gas può essere prelevato direttamente dallo spazio di testa della bottiglia di fermentazione; assumendo che il campione prelevato ha una composizione uguale a tutto il gas prodotto. Successivamente, il gas può essere iniettato nel gas-cromatografo per l'analisi cromatografica.

c) Analisi della composizione del gas

In gas-cromatografia (GC) la fase mobile è rappresentata da un gas (*carrier* o gas di trasporto) che scorre attraverso una colonna in cui è posta la fase stazionaria. All'uscita della colonna, uno o più rivelatori segnalano l'arrivo dei diversi componenti da quantificare ad un sistema di elaborazione dei segnali (Figura 1). Il risultato finale dell'analisi è rappresentato da un cromatogramma, in cui la miscela analizzata è diagrammata in funzione del tempo necessario ai vari componenti per attraversare la colonna.

Figura 1.

Rappresentazione schematica di un gas-cromatografo



I rivelatori principalmente impiegati sono di due tipi:

- rivelatore a termoconducibilità [*Hot Wire Detector* (HWD) o *Thermo Conductivity Detector* (TCD)] è un rivelatore sensibile alla concentrazione dell'analita, universale e non distruttivo. Il suo funzionamento dipende dalla

differenti conducibilità termica dei vari tipi di gas. Il TCD è formato da due filamenti, uno attraversato da *carrier* puro, l'altro dal gas in uscita dalla colonna (gas *carrier* + gas campione); i filamenti sono parte di un ponte di Wheatstone (circuito elettrico bilanciato). Quando il campione attraversa il filamento si ha una differente conduzione di calore dal filamento stesso. Di conseguenza, varia la temperatura del filamento, quindi la resistenza e ciò comporta uno sbilanciamento elettrico del ponte. Questo sbilanciamento elettrico è amplificato e mandato all'interfaccia; il segnale fornito dal rivelatore è direttamente proporzionale alla concentrazione degli analiti. La sensibilità dell'HWD dipende dalla differenza di conducibilità termica fra il gas *carrier* e l'analita, dalla concentrazione dell'analita e dalla corrente del filamento.

- rivelatore a ionizzazione di fiamma [*Flame Ionisation Detector* (FID)], è un detector universale e distruttivo. Il *carrier*, convogliato in un ugello, si miscela con aria e idrogeno, che alimentano una fiamma posta all'uscita dell'ugello. La fiamma produce una corrente ionica che viene trasformata in tensione, amplificata ed elaborata. Quando un analita raggiunge la fiamma, esso viene bruciato e ionizzato facendo variare l'intensità della corrente e permettendo la rivelazione del segnale. Il FID è capace di rilevare solo CH₄ a differenza del TCD che può determinare anche CO₂, H₂, O₂ ed N₂.

Per l'analisi dei gas mediante GC possono essere usate colonne impaccate con differenti materiali solidi assorbenti. Alcuni di questi sono polimeri porosi (Porapak, Chromosorb, Hayesep), *carbon molecular sieves* (Carboxen, Carbosieve) o particelle molecolari di metalli alluminosilicati sintetici (SUPELCO, Bullettin 1995). La scelta della colonna dipende da diversi fattori: apparecchio, condizioni analitiche (composti presenti nel campione insieme al metano), tempo di analisi per ciascun campione, tipo di detector.

Le temperature dei gas vengono scelte per mantenere il giusto compromesso tra sensibilità (separazione di tutti i composti, ripetibilità e accuratezza) e tempo richiesto per le analisi. La breve distanza di risoluzione tra azoto/aria e metano richiede basse temperature di partenza (circa 40°–50°C). Diversi gas *carrier* possono essere utilizzati per la fase mobile, come elio, azoto o argon. L'elio è il gas usato più frequentemente, sebbene per determinare l'idrogeno viene preferito l'argon, perché può esserci

interferenza tra i due gas in quanto la conducibilità termica di elio e idrogeno è simile (Lopez e Newbold, 2007).

d) Calcolo

La linearità tra la concentrazione e l'area dei picchi ottenuti nel cromatogramma vengono effettuati prima dell'analisi del campione usando appropriati standard di gas puri o in miscela.

OBIETTIVO DELLA PROVA

La prova di seguito descritta è stata effettuata per verificare se tipi diversi di carboidrati determinano produzioni diverse di metano. In particolare sette materie prime, comunemente impiegate nell'alimentazione dei ruminanti e caratterizzate da carboidrati a diversa fermentescibilità, sono state incubate *in vitro* mediante la tecnica della produzione cumulativa di gas; il gas metano prodotto durante la fermentazione è stato determinato mediante gas-cromatografia.

MATERIALE E METODI

La prova di fermentazione *in vitro* è stata realizzata seguendo il protocollo di Theodorou et al. (1994) ed incubando con liquido ruminale bovino tamponato a 39°C e in condizioni di anaerobiosi cinque serie di bottiglie, contenenti i substrati da testare. L'incubazione è stata stoppata a 6, 12, 24 e 48 ore per la determinazione della sostanza organica degradata, degli acidi grassi volatili e del metano. Le bottiglie che hanno proseguito l'incubazione fino a 120 ore sono state impiegate per studiare le cinetiche di fermentazione applicando un appropriato modello matematico.

Alimenti testati e analisi effettuate

Le sette materie prime scelte come substrati per la prova sono state: Fieno di erba medica (FM), Mais granella (MG), Orzo granella (OG), Paglia di frumento (PF), Pisello proteico (PP), Polpe di barbabietola (PB) e Silomais (SM).

Prima delle analisi tutti i substrati sono stati macinati attraverso una griglia da 1 mm mediante mulino Brabender (Wiley mill, Brabender OHG, Duisburg, Germany).

Successivamente sono stati analizzati per la composizione chimica seguendo lo schema Weende, in accordo con il metodo proposto dalla Commissione Valutazione Alimenti dell'ASPA (1980); il frazionamento dei carboidrati di struttura è stato effettuato secondo quanto riportato da Van Soest et al. (1991). L'amido è stato determinato mediante polarimetro, come riportato da Martillotti et al. (1987).

Fermentazione *in vitro*

Le caratteristiche di fermentazione sono state studiate mediante la tecnica *in vitro* della produzione cumulativa di gas (IVGPT) seguendo la metodica riportata da Calabrò (1999) e ha previsto l'incubazione in condizioni di anaerobiosi a 39°C, dei substrati macinati con inoculo costituito da liquido ruminale, a cui è stato aggiunto un medium di coltura; la produzione di gas durante il processo fermentativo è stata misurata mediante un sistema manuale costituito da un trasduttore di pressione.

Substrato

Cinque serie di bottiglie da siero da 120 ml sono state preparate: per le prime quattro serie ciascun substrato è stato pesato ($1.0040 \text{ g} \pm 0.0147$), in due repliche. Per la rimanente serie gli stessi substrati sono stati pesati (1.0273 ± 0.0285) in tre repliche. Le bottiglie sono state organizzate nel seguente modo:

Serie	N. bottiglie	Incubazione	Determinazioni
1 ^a serie	16 bottiglie	6 ore	dSO, pH, AGV
2 ^a serie	16 bottiglie	12 ore	dSO, pH, AGV
3 ^a serie	16 bottiglie	24 ore	dSO, pH, AGV
4 ^a serie	16 bottiglie	6, 12, 24 e 48 ore	CH ₄ , CO ₂
		48 ore	dSO, pH, AGV
5 ^a serie	24 bottiglie	120 ore	dSO, pH, AGV e cinetica di fermentazione

dSO: degradabilità della sostanza organica

Preparazione del medium

Il medium utilizzato (Theodorou et al., 1994) è costituito da un tampone bicarbonato e fosfato, un agente riducente, una fonte di azoto, macro- e micro-minerali e la resazurina, indicatore di ossido-riduzione.

Le soluzioni componenti il medium sono state mescolate nelle seguenti quantità:

Soluzione micromineraie:	0.5 ml
Soluzione tampone:	1 l
Soluzione macromineraie:	1 l
Resazurina:	5 ml
Acqua distillata:	2.5 l

Il medium così composto è stato sottoposto ad un continuo flusso di CO₂, fino a quando da rosa, non è diventato completamente incolore, a testimonianza di trascurabili presenze di O₂. Le bottiglie già contenenti il substrato sono state addizionate di 75 ml di medium e 4 ml di soluzione riducente. Successivamente, sono state chiuse con tappi di gomma e ghiera di alluminio e poste a 39°C fino al momento dell'aggiunta dell'inoculo. Al fine di mantenere le condizioni di anaerobiosi durante queste operazioni, anche nelle bottiglie è stata insufflata continuamente la CO₂ fino al momento della chiusura.

Preparazione dell'inoculo

Il liquido ruminale è stato prelevato al momento della macellazione da 3 bovini adulti tenuti a digiuno dalla notte precedente e alimentati con una dieta standard (PG: 12 % s.s.; NDF: 45.5 % s.s.). Il materiale prelevato è stato posto nel più breve tempo possibile, onde ridurre al minimo l'esposizione all'aria, in thermos da un litro preriscaldati con acqua calda a 40°C e trasportati in borse termiche presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti. Questa tecnica di raccolta è suggerita da Menke e Steingass (1988) quando non si dispone di animali all'interno della struttura. Quantità uguali di liquido ruminale provenienti dai tre animali sono state unificate a formare un *pool* rappresentativo. Esso è stato omogeneizzato in un frullatore per circa 60 secondi, filtrato attraverso *cheese cloth* e raccolto in un becker insufflando continuamente CO₂.

Successivamente, a ciascuna bottiglia contenente substrato e medium, sono stati addizionati 10 ml di inoculo e quindi tutte le bottiglie sono state incubate in termostato a 39°C.

Per le bottiglie della 4^a serie, destinate alla misurazione qualitativa dei gas dello spazio di testa, l'inoculo è stato aggiunto a distanza di 10 minuti per ogni bottiglia, tenendo conto del successivo tempo di attesa relativo alla corsa del campione nel gas-cromatografo.

Trasduttore di pressione

Per misurare la pressione ed il volume di gas prodotto durante la fermentazione è stato utilizzato un sistema manuale costituito da un trasduttore di pressione (Cole and Parmer Instrument Co, Illinois, USA) connesso tramite una valvola, ad un dispositivo a tre uscite. Nella prima uscita è inserito il trasduttore di pressione, nella seconda un ago ipodermico (23 gauge) che ha la funzione di collegare la bottiglia al misuratore di pressione, nella terza, infine, una siringa graduata (da 5, 10, 20 e 60 ml in relazione alla quantità di gas da misurare). Il trasduttore collegato ad un voltmetro con scala modificata a lettura digitale, misura la pressione riportata sul display direttamente in p.s.i. (pound\square inch). Inserendo l'ago nel tappo di gomma della bottiglia, il sistema permette di apprezzare la pressione interna, di misurare il corrispondente volume di gas sviluppato rilasciando lo stantuffo della siringa graduata, nonché di svuotare il sistema fino ad equilibrare la pressione interna con quella atmosferica, come indicato dalla lettura sul display del voltmetro (figura 2). Lo svuotamento dello spazio di testa evita l'accumulo di componenti gassosi che potrebbero diminuire la velocità del processo fermentativo (Calabrò, 1999).

Figura 2.
Trasduttore di pressione



Cinetica di fermentazione

Durante le 120 ore di fermentazione sono state effettuate 19 misurazioni (ad intervalli compresi tra 2 e 24 ore) quantitative del gas prodotto sulle bottiglie della 5^a serie. Le letture risultano essere più frequenti nelle prime 48 ore di fermentazione perché le pressioni interne aumentano rapidamente, richiedendo così una siringa più capiente per la misurazione del gas prodotto; durante l'ultima fase della fermentazione le quantità di gas, invece, risultano più contenute. Alla fine di ogni lettura le bottiglie vengono agitate con un movimento rotatorio su di un piano.

Modello matematico

Per ogni bottiglia a ciascun tempo di incubazione, i volumi cumulativi di gas ottenuti sono stati rapportati alla sostanza organica incubata ed elaborati con il modello monofasico di Michaelis-Menten modificato da Groot et al. (1996):

$$G = A / (1 + (C/t)^B)$$

dove G rappresenta la quantità di gas (ml/g) prodotta al tempo t; A la produzione potenziale di gas (ml/g); B il tempo necessario a produrre una quantità di gas pari ad A/2; C una costante che definisce la forma della curva. Ammettendo l'esistenza di una relazione lineare tra produzione di gas e fermentazione del substrato, è possibile calcolare il tempo a cui si raggiunge la velocità (T_{max} , h), nonché la velocità massima di fermentazione (R_{max} , ml/h), come riportato da (Bauer et al., 2001):

$$R_{max} = [A \cdot C^B \cdot B \cdot (T_{max}^{-(B-1)})] / [1 + C^B \cdot (T_{max}^{-B})]^2$$

$$T_{max} = C \cdot \{[(B - 1) / (B + 1)]^{1/B}\}$$

La velocità aumenta fino a raggiungere il valore massimo quando sia lo sviluppo della popolazione microbica sia l'alimento non limitano la degradazione e la fermentazione del substrato.

Prodotti finali di fermentazione

Al termine delle 6, 12, 24, 48 e 120 ore di incubazione, rispettando i prestabiliti tempi per ogni serie, le bottiglie sono state aperte e, tramite una sonda, è stato determinato il pH (pH-metro: Alessandrini Instruments, elettrodo di vetro mod. Jenway-3030) per verificare l'efficienza del sistema tampone ed individuare eventuali fermentazioni anomale.

Sostanza organica degradata

Il contenuto di ciascuna bottiglia è stato filtrato attraverso crogioli di vetro prepesati e a setto poroso (*Schott Duran*, porosità #2) sciacquando con acqua distillata calda. I crogioli sono stati posti per una notte in stufa a 103°C, e successivamente, per 3 ore in muffola a 550°C al fine di determinare rispettivamente la sostanza secca ed organiche residue. Quindi, per differenza è stata calcolata la sostanza organica degradata (dSO, %) tra quella incubata e quella residua.

Acidi grassi volatili

A 6, 12, 24, 48 e 120 ore di incubazione sono stati determinati gli acidi grassi volatili (AGV): un campione di 5 ml è stato prelevato dalle bottiglie di fermentazione, centrifugato a 12000 giri per 30 minuti (a 10°C) e diluito 1:1 con una soluzione di acido ossalico 0.06 M. Gli AGV (acetico, propionico, isobutirrico, butirrico, isovalerianico e valerianico) sono stati determinati mediante gas cromatografo (ThermoElectron® model. 8000^{top} Italy, FUSED SILICA Gascromatogram con OMEGAWAX 250 fused silica capillary column SUPELCO 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm film thickness) utilizzando uno standard costituito dalla miscela dei sei acidi. Le temperature di analisi sono state: forno 175°C, FID 240°C; il gas *carrier* (elio) è stato usato al flusso di 1,7 ml/min.

Quantificazione di gas di fermentazione

Al fine di quantificare il metano, 3 ml del gas di fermentazione sono stati prelevati in doppio da ciascuna bottiglia dopo aver misurato la pressione e il volume totale del gas nello spazio di testa. I campioni di gas sono stati raccolti mediante siringhe Hamilton da 5 ml munite di appositi rubinetti a tenuta di gas. Il campione prelevato è stato analizzato utilizzando un gas cromatografo ThermoElectron® 8000^{top} tramite un sistema di rilevazione a termo-conducibilità (TCD o HWD). L'elio è stato utilizzato come gas *carrier* al flusso di 30 ml/min. Le diverse aree dello strumento erano state impostate alle seguenti temperature: forno 50°C, detector 190°C, filamenti 210°C. Al fine di migliorare l'accuratezza della determinazione l'iniezione è stata fatta attraverso un loop. Il campione è stato separato mediante il passaggio in una colonna HaySepQ SUPELCO (3/16 inch, mesh 80/100).

Come standard per il confronto e l'identificazione dei picchi è stato utilizzato gas metano al 99,9 %. Il CH₄ è stato misurato a 6, 12, 24 e 48 ore. Ogni corsa ha avuto una durata di 5 minuti.

Elaborazione dei dati

Per i dati ottenuti a 120 ore, tutti i parametri stimati dal modello (A , B , R_{\max} e t_{\max}), nonché il volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza organica incubata (VCSO, ml/g) e degradata (Yield, ml/g), la degradabilità della sostanza organica (dSO, %), il pH e gli AGV sono stati elaborati mediante analisi della varianza (Procedura GLM, del pacchetto statistico SAS, 2000), secondo il seguente modello:

$$y_{ij} = \mu + S_i + \varepsilon_{ij}$$

dove y rappresenta ogni caratteristica di fermentazione, μ rappresenta la media, S è l'effetto substrato ($i = 1-7$) ed ε l'errore. Analoga elaborazione statistica è stata effettuata separatamente per i dati relativi al metano (espresso come ml/g di s.s. incubata, % del gas totale e ml/g di sostanza organica degradata).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Composizione chimica

Come è possibile osservare dalla tabella 1, i sette substrati testati differiscono per la loro composizione chimica, avendo per ciascun componente un *range* abbastanza ampio (% s.s.): proteine grezze da 3.01 a 28.74, lipidi grezzi da 0.55 a 3.72, NDF da 15.92 a 73.27, NSC da 12.70 a 63.97. Complessivamente i dati ottenuti rientrano nei valori tabulati (INEA, 1996).

Caratteristiche e cinetiche di fermentazione

Le caratteristiche di fermentazione ottenute dopo 120 ore di incubazione sono riportate in tabella 2. Come atteso, tutti i parametri studiati sono risultati statisticamente influenzati dal tipo di substrato ($P < 0.01$) ed in linea con il loro contenuto in carboidrati. Entrambe le granelle di cereali hanno mostrato sia produzioni di gas che degradabilità della sostanza organica abbastanza alte rispetto agli altri alimenti (VCSO: 332 e 383 ml/g, dSO: 80.63 e 84.32 %, per orzo e mais, rispettivamente). Le polpe di barbabietola hanno riportato la più elevata produzione di gas rispetto a tutti i substrati incubati

(VCSO: 411.7 ml/g; $P<0.01$), ma non la maggiore quantità di SO degradata (dSO: 78.63 %). Rispetto a tutti gli altri substrati, il fieno di erba medica e la paglia di frumento hanno avuto le fermentazioni più contenute (VCSO: 264 e 301 ml/g, rispettivamente; $P<0.01$) e hanno mostrato anche valori più bassi di degradabilità, (63.28 % e 59.53 %, rispettivamente). Il pisello proteico ha presentato la più alta degradabilità (93,5 %) a fronte di una produzione di gas di VCSO: 342 ml/g; probabilmente a causa dell'elevato contenuto proteico di tale granella.

Per meglio discutere le cinetiche di fermentazione ottenute nei sette campioni, nelle figure 4 e 5 vengono riportati, per ciascun substrato, gli andamenti della produzione di gas e della velocità di fermentazione. Come atteso, le granelle hanno mostrato una velocità massima di fermentazione superiore molto verosimilmente per il più alto contenuto di carboidrati non strutturali; come riportato in precedenti studi (Calabrò et al., 2001) l'amido di mais si è confermato essere lentamente degradabile. Il comportamento delle polpe di barbabietola è risultato particolare: a partire da 12 ore ha mostrato un rapido aumento della produzione di gas, che si è mantenuta la più elevata fino a 120 ore di incubazione. La sua velocità massima è risultata simile a quella dei concentrati a conferma della particolarità della sua componente fibrosa intermedia. Come atteso la cinetica di fermentazione della paglia è molto lenta rispetto agli altri substrati, indice della presenza di una maggiore quota di carboidrati lentamente fermentescibile (NDF: 73.27 % s.s.).

I valori di pH registrati a 120 h e gli AGV prodotti sono riportati in tabella 3. Il tipo di substrato ha avuto un effetto significativo sul pH ($P<0.01$) i cui valori si sono mantenuti su livelli piuttosto bassi, compresi in un *range* che varia da 5.98 a 6.39, scendendo in più di una caso al di sotto di 6.2, valore minimo indicato per una buona attività dei cellulolitici (Dijkstra et al., 1992).

In ogni caso se si escludono orzo e pisello la correlazione gas/AGV risulta altamente significativa ($P<0.01$) e la successiva regressione del gas sugli AGV presenta un valore di *b* pari a 41,6 ml gas/mM AGV (dati non in tabella), non molto diverso dal valore riportato da Dohane et al. (1997) pari a 36,6; a prova di un normale andamento delle fermentazioni.

La produzione di AGV è influenzata significativamente ($P<0.05$) dal substrato; la loro concentrazione è compresa tra 114,78 mM/g del pisello proteico a 65,95 mM/g del fieno di erba medica. Il rapporto acetato/propionato (A/P) ha mostrato i valori più elevati per paglia e fieno (2.13 e 2.12, rispettivamente). L'elevato tenore in proteine nel pisello

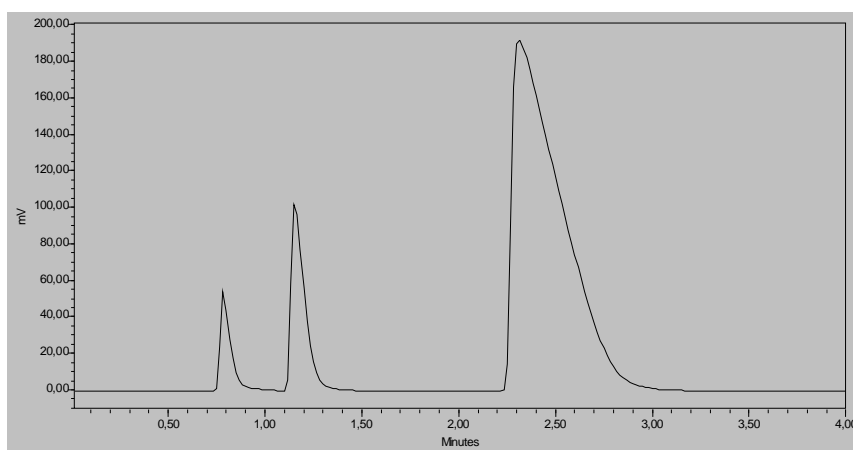
proteico ha portato anche il maggior contenuto in acidi grassi a catena ramificata (isobutirrico, iso-valerianico e valerianico: 9.23, 4.43 e 3.36 mM/g, rispettivamente), che, come è noto, derivano dalla degradazione di valina, leucina e prolina, rispettivamente (McDonald et al., 2002).

Produzione di metano

Per quanto riguarda l'emissione di gas metano durante l'incubazione *in vitro*, i risultati ottenuti sono stati riportati nelle figure 6, 7 e 8 e nelle tabelle 4, 5. Nella figura 3 è illustrato un esempio di cromatogramma ottenuto in GC; nell'ordine i picchi corrispondono ai gas: aria, metano e anidride carbonica.

Figura 3.

Esempio di cromatogramma



In tutti i substrati (ad eccezione del mais), la percentuale di metano aumenta con l'aumentare del tempo di incubazione (figura 7 e tabella 4), suggerendo che la lenta digeribilità delle frazioni di glucidi di struttura è associata con una più alta produzione di metano (Getachew et al. 2005). In accordo con gli stessi autori, anche nel nostro caso, circa il 50 % del metano è prodotto tra le 6 e le 24 ore di fermentazione.

In tabella 4 si può notare che:

- entro le prime 12 ore mais orzo e pisello proteico presentano la maggiore percentuale di metano prodotto sul totale dello stesso;
- tra le 12 e le 24 ore la produzione di CH₄ è accelerata per l'erba medica, la paglia di frumento, le polpe e il silomais;

- solo la paglia nelle prime 24 ore ha prodotto una quantità di metano inferiore al 50%.

Per meglio valutare il potere metanogenico dei substrati oggetto di studio si è ritenuto interessante rapportare la produzione di metano alla sostanza organica degradata. In realtà per un prodotto come il metano è indicativo collegare i suoi valori alla degradabilità della sostanza organica (Moss, 2003).

Tutti i substrati hanno mostrato una buona percentuale di sostanza organica degradata. Come riportato da Blümmel et al. (2005), la digeribilità della SO è altamente correlata con l'emissione di metano, infatti la influenza in modo negativo. Anche se Taweel et al., 2005 recentemente ha dimostrato che questo principio non è valido in modo assoluto.

Come c'era da attendersi, come anche descritto da Moe e Tyrrell (1979), i dati riportati in figura 8 e tabella 6, emerge che paglia di frumento, fieno e silomais, più ricchi in glucidi parietali, presentano la produzione più elevata di metano (44.9, 39.1, 37.6 ml/g). Infine, granella di mais e pisello proteico mostrano minori produzioni di metano (22.2 e 22.3 ml/g).

Per quanto concerne il comportamento dell'orzo anche Lee et al. (2003) hanno presentato produzioni di metano più elevate per alcune granelle di cereali rispetto ad alcuni foraggi (frumento e avena). Secondo questi autori il risultato sarebbe ascrivibile all'elevato contenuto nelle granelle di glucidi facilmente disponibili che favorirebbero una più intensa proliferazione di microrganismi ruminanti ed in particolare dei protozoi, impegnati nel trasferimento di idrogeno ai batteri metanogeni (Bonhomme et al., 1990). Mais e insilati possono ridurre l'emissione del metano *in vivo* (Beauchemin et al., 2008), principalmente in due modi:

- l'amido contenuto nell'insilato favorisce la produzione del propionato;
- aumentando l'ingestione volontaria, possono ridurre i tempi di permanenza e, quindi di fermentazione nel rumine, promuovendo la digestione post-ruminale.

Nelle condizioni *in vitro*, la permanenza forzata dell'alimento potrebbe influire in questo senso.

Il pisello proteico con il più elevato contenuto di proteine rispetto agli altri alimenti ha prodotto complessivamente una bassa quantità di metano; in questo caso tale risultato può essere attribuito a vari fattori:

- le proteine a livello ruminale sono degradate ad NH_4^+ che reagisce con la CO_2 , contribuendo alla produzione di bicarbonato di ammonio e competendo per la produzione di CH_4 (Getachew, 1998; Lee et al., 2003);
- la presenza di fattori antinutrizionali (Beauchemin et al., 2008), tipico delle leguminose, interferisce con la produzione di CH_4 .
- buon bilanciamento tra energia e azoto e quindi una migliore efficienza microbica, come riportato in altri studi *in vitro* (Buccioni et al., 2007; Calabrò et al., 2009).

L'elevata produzione iniziale di metano delle polpe di barbabietola può essere correlata al suo elevato contenuto in pectine. Dehority (1969) ha evidenziato numerose specie batteriche capaci di utilizzare la pectina come substrato per le loro fermentazioni con produzione di elevata quantità di acido butirrico, acido formico e idrogeno, quest'ultimo necessario ai metanogeni per la sintesi del metano. Anche nel nostro caso le polpe di barbabietola hanno presentato la maggiore concentrazione di butirrato (5.9 mM/g) nell'intervallo 12-24 ore.

La produzione di metano del fieno dell'insilato e della paglia è ascrivibile alla fermentazione dei glucidi parietali, in accordo con l'osservazione di Moss et al. (2000) che indica la fibra digeribile come una delle principali fonti di gas metano a livello ruminale.

Come riportato da diversi autori la produzione di metano nei ruminanti tende a diminuire con una migliore qualità dei foraggi (Maas, 1987); è questo il motivo per cui si ha anche la bassa produzione di acido propionico sia a 12 che a 24 ore (tabella 6).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente studio, hanno dimostrato che anche *in vitro* è stato possibile osservare come la composizione chimica degli alimenti, e soprattutto la quantità e qualità dei carboidrati, influenzano la produzione di metano, sebbene ulteriori studi necessitano per approfondire l'argomento in tutti suoi complessi aspetti.

Secondo Blaxter e Clapperton (1965) la produzione di metano nei ruminanti varia in funzione del livello di ingestione; al mantenimento si ha un aumento del metano con l'aumento della digeribilità della dieta, mentre un comportamento inverso si osserva ad un livello di ingestione pari a tre volte il mantenimento.

Molte stime relative alla capacità metanogenica dei nutrienti (Bannink et al. 2006; Manteny e Bannink 2004) sono basate su calcoli stechiometrici e non esistono riscontri *in vivo*.

L'aumento della digeribilità dei carboidrati parietali nei foraggi determina sicuramente una minore perdita di metano. Anche l'impiego di granelle, e del mais in particolare, favorisce una minore quota di metano prodotto.

Tabella 1.*Composizione chimica (% s.s.) de substrati testati*

	S.S.	Proteine grezze	Estratto etereo	Fibra grezza	NDF	ADF	ADL	NSC	Amido	Ceneri
Fieno di erba medica	94.39	16.69	2.24	27.58	49.96	32.22	8.31	20.47	-	10.64
Mais granella	88.93	12.17	3.72	4.33	15.92	6.77	2.06	63.97	72.6	4.22
Orzo granella	87.20	10.29	1.51	3.92	24.05	8.90	1.03	61.67	58.0	2.48
Paglia di frumento	92.46	3.01	1.21	42.02	73.27	50.05	8.32	12.70	-	9.81
Pisello proteico	93.00	28.74	0.55	5.11	35.48	5.34	2.34	30.93	49.3	4.30
Polpe di barbabietole	90.75	9.30	1.27	21.50	52.00	31.00	1.90	32.87		4.56
Silomais	94.30	7.26	1.37	23.81	58.97	26.26	3.73	28.27	18.75	4.13

PG: proteine grezze; FG: fibra grezza; NDF: fibra neutro detersa; ADF: fibra acido detersa; ADL: lignina acido detersa.
NSC: carboidrati non strutturali (100- PG – EE – NDF – ceneri)

Tabella 2.*Caratteristiche di fermentazione in vitro a 120 h dei substrati testati*

	dSO	VCSO	Yield	A	B	tmax	Rmax
	%	ml/g	ml/g	ml/h	h	h	%/h
Fieno di erba medica	63.28 ^C	264.7 ^F	418.33 ^C	280.00 ^C	18.13 ^C	2.01 ^C	10.78 ^C
Mais granella	84.32 ^A	332.0 ^D	394.00 ^{CD}	370.00 ^B	16.70 ^C	2.57 ^C	14.79 ^B
Orzo granella	80.63 ^A	383.0 ^B	475.33 ^B	408.67 ^A	13.57 ^D	2.25 ^C	19.81 ^A
Paglia di frumento	59.53 ^C	301.0 ^E	507.33 ^A	364.00 ^B	35.97 ^A	10.71 ^A	6.22 ^D
Pisello proteico	93.53 ^A	342.7 ^D	366.33 ^D	355.67 ^B	10.87 ^E	2.14 ^C	21.08 ^A
Polpe di barbabietola	78.63 ^B	411.7 ^A	523.67 ^A	416.00 ^A	14.83 ^D	7.92 ^B	17.90 ^A
Silomais	69.62 ^C	365.0 ^C	524.00 ^A	425.00 ^A	21.87 ^B	2.18 ^C	13.90 ^B
Varianza dell'errore	6.70	113	420	158	1.00	0.61	1.11
Prob. t	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

dSO: degradabilità della sostanza organica; VCSO: volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza organica incubata; Yield: volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza organica degradata; A: produzione potenziale di gas; B: tempo necessario per la produzione di una quantità di gas pari ad A/2; R_{max}: velocità massima di fermentazione; t_{max}: tempo a cui si raggiunge la velocità massima.

Lettere diverse lungo la colonna indicano differenze statisticamente significative: A, B, C, D; E; F: P<0.01.

Tabella 3.*pH e acidi grassi volatili prodotti dopo 120 h di fermentazione in vitro*

	pH	Acetico	Propionico	Isobutirrico	Butirrico	Isovalerianico	Valerianico	AP	tAGV
		<i>mM/g*</i>							<i>mM/g</i>
Fieno di erba medica	6.39 ^A	35.14 ^C	16.59 ^C	6.18 ^{AB}	4.95 ^D	1.57 ^C	1.54 ^D	2.13 ^{AB}	65.95 ^C
Mais granella	6.16 ^B	39.43 ^{BC}	26.27 ^{AB}	7.26 ^A	6.39 ^D	3.09 ^B	2.92 ^A	1.51 ^B	85.34 ^B
Orzo granella	6.01 ^C	36.01 ^C	18.74 ^C	2.67 ^B	9.04 ^C	1.62 ^{CD}	2.07 ^{BC}	1.91 ^{AB}	70.15 ^C
Paglia di frumento	6.15 ^B	48.51 ^{BA}	22.88 ^{BC}	3.41 ^B	6.66 ^D	1.40 ^D	1.36 ^D	2.12 ^A	84.23 ^B
Pisello proteico	6.18 ^B	53.55 ^{AB}	31.22 ^A	9.23 ^A	13.02 ^A	4.43 ^A	3.36 ^A	1.72 ^{AB}	114.78 ^A
Polpe di barbabietola	5.98 ^C	59.87 ^A	30.23 ^A	3.79 ^B	10.66 ^B	1.99 ^C	2.30 ^B	1.97 ^{AB}	108.83 ^{AB}
Silomais	6.02 ^C	52.94 ^{AB}	28.40 ^A	4.44 ^B	8.56 ^C	2.18 ^C	1.69 ^{CD}	1.87 ^{AB}	98.21 ^{AB}
Varianza dell'errore	0.0011	34.0	4.26	3.11	0.504	0.140	0.0325	0.0434	70.3
Prob. t	<0.001	0.0058	<0.001	0.0247	<0.001	<0.001	<0.001	0.1001	0.0007

*gli acidi grassi sono riportati come millimoli per litro per g di sostanza organica incubata (mM/g).

AP: rapporto acetato/propionato; AGV: acidi grassi volatili.

Lettere diverse lungo la colonna indicano differenze statisticamente significative: A, B, C, D: P<0.01.

Tabella 4.

dSO % e produzione di CH₄ a 48 ore e produzione di CH₄ a vari intervalli di tempo

Substrati			Produzione di metano					
	dSO	CH ₄	0 – 6 h	6 – 12 h	12 – 24 h	24 – 48 h	0 – 12 h	0 – 24 h
	%	ml/g*	ml/g				% del CH ₄ totale	
Fieno di erba medica	51.14	17.51	2.85	2.84	5.74	6.08	32.50	65.30
Mais granella	73.63	15.62	3.42	3.59	5.22	3.39	44.88	78.30
Orzo granella	72.86	25.71	3.89	6.54	7.98	7.30	40.57	71.61
Paglia di frumento	43.80	17.71	1.43	1.55	5.78	8.95	16.82	49.46
Pisello proteico	92.10	19.77	4.55	4.58	5.18	5.46	46.18	72.38
Polpe di barbabietola	82.25	27.80	2.03	6.20	13.04	6.53	29.60	76.51
Silomais	54.16	17.71	2.21	3.61	5.85	7.84	29.83	59.81

*CH₄ è riportato come ml per g di sostanza secca incubata

Tabella 5.*Produzione di CH₄ rapportato alla SO degradata ai diversi tempi di incubazione*

Substrato	6 h	12 h	24 h	48 h
	<i>ml/g</i>	<i>ml/g</i>	<i>ml/g</i>	<i>ml/g</i>
Fieno di erba medica	14.6 ^b	17.5 ^B	25.3 ^{BC}	39.1 ^A
Mais granella	11.3 ^b	16.1 ^B	18.7 ^b	22.2 ^B
Orzo granella	12.8 ^b	23.5 ^{AB}	28.9 ^{BC}	36.7 ^A
Paglia di frumento	.	34.0 ^A	45.0 ^A	44.9 ^A
Pisello proteico	14.7 ^b	15.3 ^B	19.5 ^a	22.3 ^B
Polpe di barbabietola	23.8 ^a	17.6 ^{AB}	31.4 ^B	35.4 ^A
Silomais	13.2 ^b	23.0 ^{AB}	24.8 ^C	37.6 ^A
Varianza dell'errore	12.85	22.7	4.80	17.6
Prob. t	NS	*	***	***

Lettere diverse lungo la colonna indicano differenze statisticamente significative: a, b, c: P<0.05; A, B, C: P<0.01.

NS, *, ***: non significativo, P<0.05, P<0.001.

Tabella 6.*Produzione di acidi grassi volatili (mM/g di s.s. incubata) ai vari intervalli di tempo*

	Acetico	Propionico	Butirrico	t AGV	A/P
0 – 12 ore di incubazione					
Fieno di erba medica	11.70	5.13	1.68	19.71	2.29
Mais granella	11.64	6.79	2.28	22.18	1.71
Orzo granella	22.63	9.77	2.26	38.67	2.59
Pisello proteico	9.23	3.60	1.37	15.29	2.56
Polpe di barbabietola	9.89	4.61	1.47	17.69	2.15
Paglia di frumento	10.82	5.25	1.85	18.63	2.06
Silomais	13.16	6.70	1.33	23.57	1.96
0 – 24 ore di incubazione					
Fieno di erba medica	34.39	17.79	4.40	61.70	1.93
Mais granella	20.29	17.06	2.09	45.61	1.20
Orzo granella	13.73	7.86	3.84	27.38	1.74
Pisello proteico	6.85	4.65	2.78	13.78	1.49
Polpe di barbabietola	14.70	7.58	5.29	29.43	1.94
Paglia di frumento	18.82	9.15	4.07	32.66	2.06
Silomais	12.97	6.37	1.27	22.81	2.07

tAGV: acidi grassi totali (acetico + propionico + butirrico + isobutirrico + valerianico + isovalerianico); AP: rapporto acetato/propionato.

Figura 4.

Andamento della produzione di gas nei substrati testati

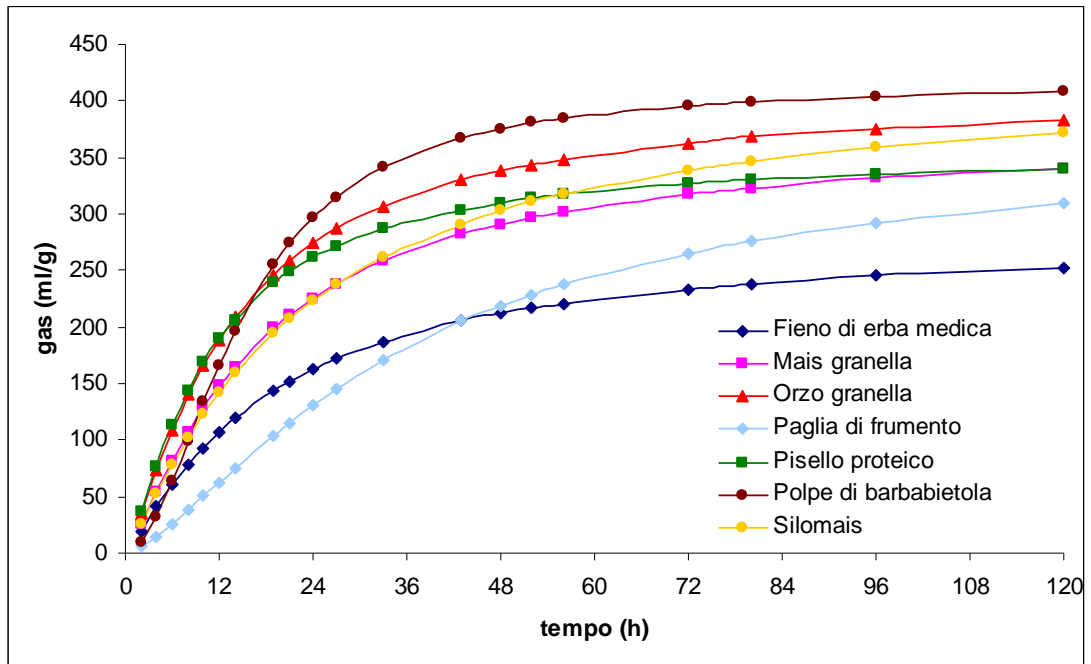


Figura 5.

Andamento della velocità di fermentazione nei substrati testati

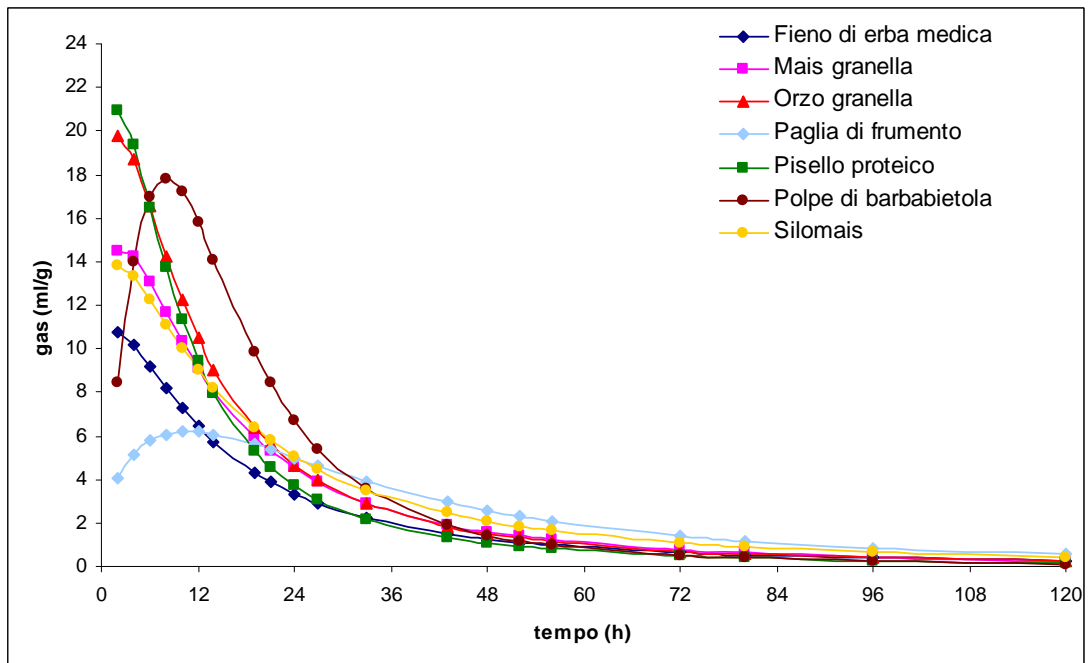


Figura 6.

Andamento della produzione del metano (ml/g s.s .incubata)

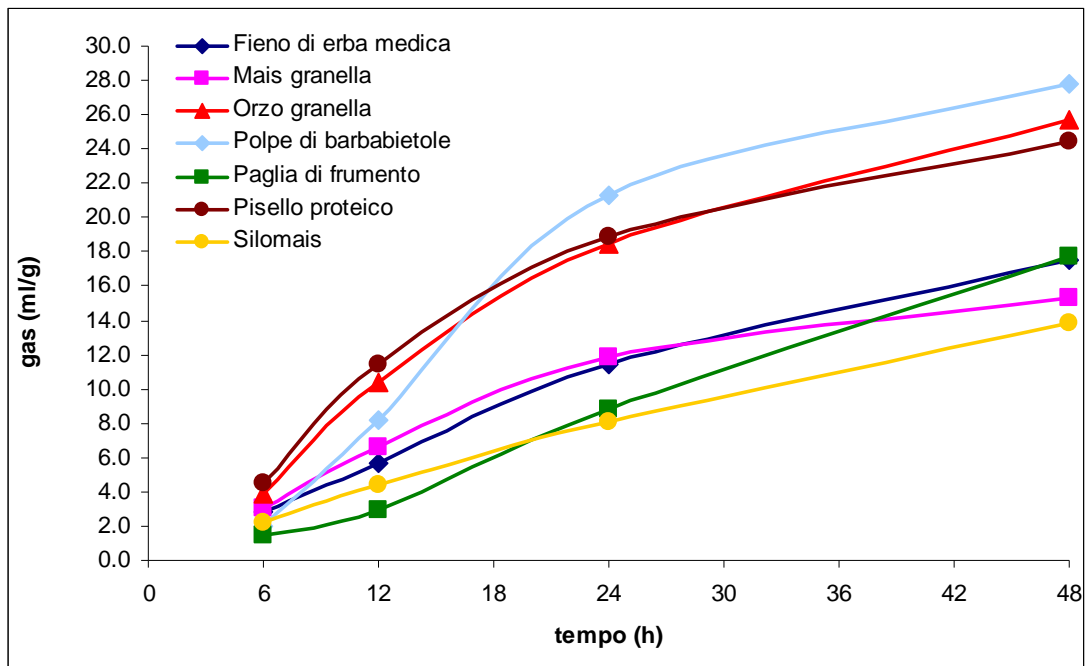


Figura 7.

Produzione di metano (%) ai diversi intervalli di incubazione nei substrati incubati

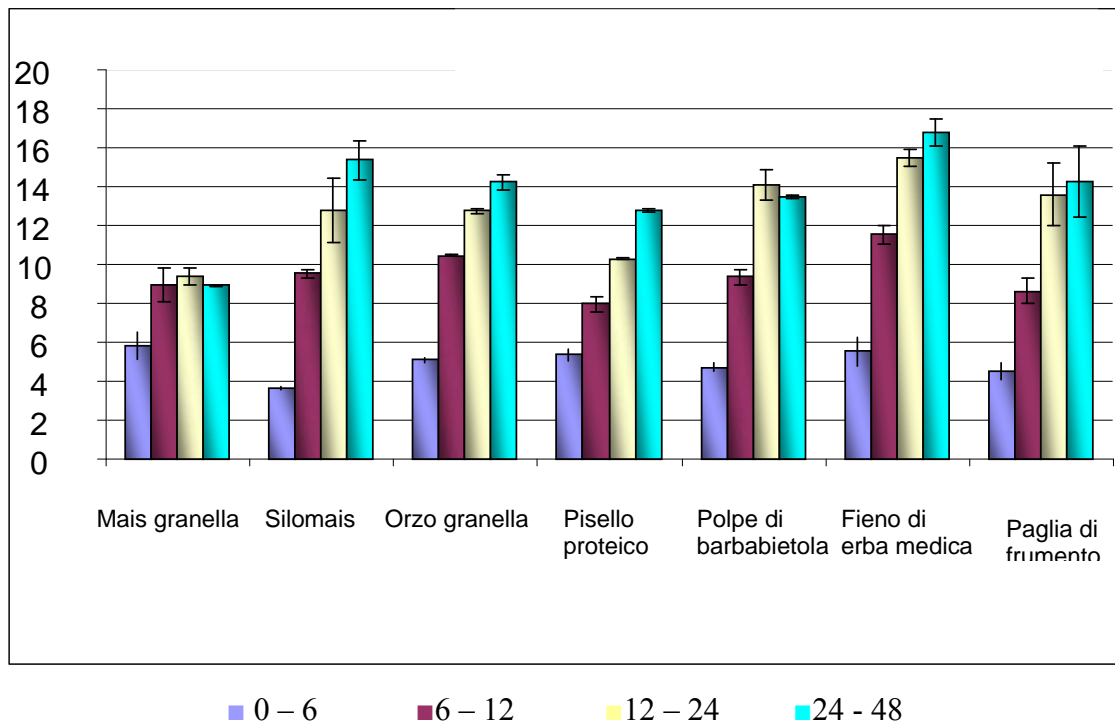
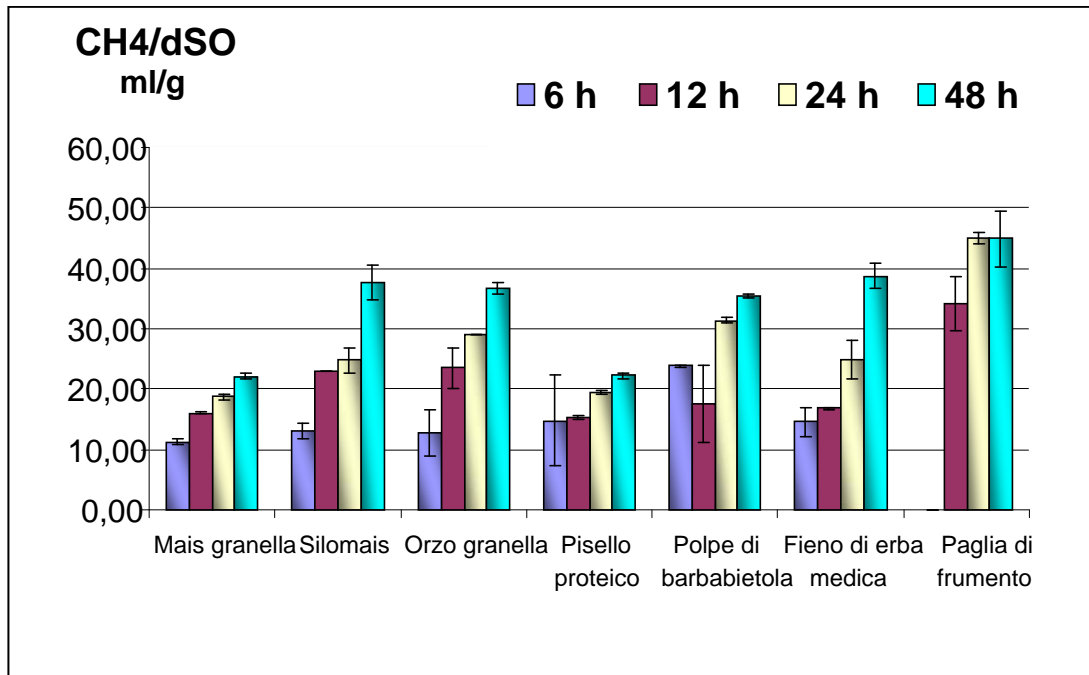


Figura 8.

Produzione di metano (ml/g di S.O. degradata) ai vari tempi di incubazione



CAPITOLO 3.

Stima *in vitro* del metano in diete per ruminanti a base di soia f.e. e favino

INTRODUZIONE

Le colture proteiche sono tornate in questi anni al centro dell'interesse degli agricoltori per una serie di motivi: la BSE ha messo al bando le farine di origine animale, è aumentata la richiesta di fonti proteiche OGM-free, esiste una dipendenza economica e politica (la Comunità Europea si affida alle importazioni per il 75% del suo fabbisogno); risulta, quindi necessario diversificare le fonti di approvvigionamento di tali materie prime. Inoltre, la crescente attenzione del mercato verso prodotti aventi caratteristiche di salubrità e qualità tali da garantire maggiore sicurezza alimentare, come possono essere i prodotti biologici, hanno indotto gli allevatori ad intraprendere nuove vie e innovative tecniche per soddisfare le esigenze del consumatore moderno.

Le proteaginosi tipiche mediterranee quali favino, pisello proteico, lupino e cece, hanno dimostrato grande flessibilità di utilizzo e facilità di produzione nelle diverse condizioni agronomiche, spesso molto più della soia, specie non autoctona degli ambienti mediterranei (Martini et al., 2005). Gli sfarinati ricavati dalle granelle di favino (*Vicia faba minor*) e di pisello proteico (*Pisum sativum*), possono sostituire la farina d'estrazione di soia nell'alimentazione biologica del bestiame, anche se il loro uso può comportare problemi di utilizzazione digestiva a causa della presenza di sostanze antinutrizionali (polifenoli tannici nel tegumento) che, per la loro proprietà di formare legami stabili soprattutto con le proteine, possono limitarne l'impiego nel razionamento delle specie di interesse zootecnico.

Dal punto di vista nutrizionale, le diverse fonti proteiche si distinguono per il diverso contenuto proteico, per una diversa fermentescibilità ruminale (Calabrò et al., 2009), ma anche per la differente quantità di proteine che by-passano il rumine e giungono indegredate in sede intestinale (Licitra et al., 2001). La possibilità di sostituire totalmente o parzialmente la soia f.e. con il favino nella formulazione di diete per

ruminanti risulta importante in una prospettiva di produzione agro-sostenibile. Questa granella, infatti, migliora la fertilità del terreno e può ridurre la consistenza delle concimazioni azotate e, per la presenza di tannini potrebbe contenere anche la produzione di metano.

Diverse recensioni hanno proposto strategie alimentari per ridurre le emissioni di metano da parte dei ruminanti (Johnson e Johnson, 1995): la produzione di metano per unità di sostanza secca ingerita può essere ridotta incrementando l'ingestione di alimento (Mathison et al., 1998), in animali al pascolo le emissioni di CH₄ sarebbero ridotte da un aumento delle concimazioni con azoto inorganico e da una migliore digeribilità delle essenze foraggere presenti (Lovett et al., 2004). Il rapporto foraggio:concentrati delle diete, e quindi la disponibilità di carboidrati a diversa fermentescibilità influenza i prodotti finali di fermentazione: acidi grassi volatili, anidride carbonica e metano (Eun et al., 2004). Un altro parametro fondamentale da considerare nella produzione di metano nel rumine è l'attività della popolazione microbica, e dei batteri metanogeni in particolare. È stato osservato che esiste una relazione diretta tra l'efficienza nella sintesi delle proteine microbiche e la riduzione della produzione di metano (Rooke et al., 1985). Al fine di massimizzare le performance animali è necessario assicurare nel rumine ottime condizioni di crescita per i batteri ed equilibrare il rapporto energia/azoto per ottimizzare l'efficienza di utilizzazione dei nutrienti assorbiti; se tutto ciò viene realizzato si otterrà una ridotta emissione di metano per unità di prodotto animale ricavato: carne, latte, ecc. (Moss, 1993).

Per la misurazione del metano prodotto a seguito delle fermentazioni *in vitro* in alternativa alla gas-cromatografia (Blummel e Ørskov, 1993; Lopez e Newbold, 2007), può essere utilizzata anche una semplice metodica chimica descritta da Pell e Schofield (1992), che permette di determinare inversamente il metano prodotto impiegando l'idrossido di sodio e un trasduttore di pressione manuale. La metodica sfrutta il principio della solubilità di alcuni gas, nel nostro caso CO₂, in ambiente alcalino e consente stima dei gas insolubili (nel nostro caso CH₄).

OBIETTIVO DELLA PROVA

Nella prova di seguito riportata sono state determinate le caratteristiche di fermentazione ed il metano prodotto incubando *in vitro* sei ipotetiche diete per ruminanti caratterizzate da diverso contenuto proteico e rapporto energia/azoto. Allo scopo di proporre nelle diete per ruminanti altre leguminose quali fonti proteiche alternative alla soia, tre delle sei diete sono state formulate sostituendo la soia f.e. con il favino.

Inoltre, per la stima del metano prodotto a seguito delle fermentazioni ruminali, è stato utilizzato un semplice metodo chimico che si basa sul principio dell'insolubilità del CH₄ in ambiente alcalino.

MATERIALE E METODI

Una prova di fermentazione *in vitro* è stata realizzata impiegando la tecnica della produzione cumulativa di gas (IVGPT).

Le materie prime impiegate per preparare le diete (paglia di frumento, granella di mais, favino e soia f.e.) sono state macinate con griglia 1 mm mediante mulino Brabender (Wiley mill, Brabender OHG, Duisburg, Germany) e sottoposte alle analisi standard: composizione chimica (schema Weende, Commissione Valutazione Alimenti, ASPA 1980) e frazionamento dei carboidrati di struttura (Van Soest et al., 1991). Impiegando i risultati ottenuti dalla composizione chimica, per ciascuna fonte proteica (favino e soia f.e.) sono state formulate tre diete per ruminanti con tre diversi contenuti proteici (10, 13 e 15 % s.s.) e rapporto energia/azoto (UFL/PG: 0.070, 0.064 e 0.058, rispettivamente) denominate FD_10, FD_13, FD_15 e SD_10, SD_13 e SD_15, rispettivamente. Le caratteristiche delle diete utilizzate sono riportate in tabella 1.

Caratteristiche di fermentazione *in vitro*

Le caratteristiche di fermentazione dei foraggi sono state studiate mediante IVGPT seguendo la metodica riportata da Calabrò (1999). Essa ha previsto l'incubazione in condizioni di anaerobiosi a 39°C, per 120 ore, dei substrati essiccati e macinati con inoculo costituito da liquido ruminale (raccolto al momento della macellazione da bovini adulti) cui è stato aggiunto un medium di coltura; la produzione di gas durante il

processo fermentativo è stata misurata mediante un sistema manuale costituito da un trasduttore di pressione.

Per l'incubazione *in vitro* delle sei diete sono state preparate due serie di bottiglie di capacità 120 ml:

- 1^a serie: l'incubazione si è protratta per 120 ore e ha previsto tre repliche per ciascuna dieta ($1.0153 \text{ g} \pm 0.0117$) ed è stata destinata a determinare la cinetica di fermentazione;
- 2^a serie: ha previsto due repliche per ciascun substrato ($1.0173 \text{ g} \pm 0.0106$) ed è stata impiegata, oltre che per determinare i parametri di fermentazione (pH, degradabilità, produzione di gas, acidi grassi volatili e ammoniaca) per quantificare il metano prodotto a 6, 12, 24, 48 e 72 ore di incubazione mediante il metodo chimico descritto da Hungate (1955) e modificato da Pell e Schofield (1992).

Per una descrizione dettagliata delle metodiche riguardanti la preparazione del medium e dell'inoculo, la misurazione del pH e la determinazione della sostanza organica (dSO, %), nonché l'analisi degli acidi grassi volatili (AGV, mM/g SO incubata) e dell'ammoniaca (NH_3 , mg/g) si rimanda al capitolo 2.

Determinazione del metano

Per la determinazione della frazione di CH_4 , presente nel gas prodotto durante la fermentazione, e raccolto nello spazio di testa delle bottiglie, è stata seguita la seguente procedura:

- in bottiglie da siero (50 ml), sigillate con tappi di gomma, contenenti 5 ml di NaOH al 10 % e mantenute in incubatore a 39°C , sono stati iniettati 10 ml di aria, avendo cura di mantenere costante la temperatura della soluzione, dell'aria e delle bottiglie stesse;
- dopo agitazione è stato misurato il cambiamento di pressione legato all'aggiunta dell'aria (PSI_{aria}), mediante un trasduttore di pressione manuale, e registrato, l'aria è stata eliminata riportando la pressione all'interno della bottiglia a pressione atmosferica;
- successivamente, 10 ml di gas di fermentazione, prelevato dallo spazio di testa delle bottiglie, sono stati iniettati nelle bottiglie da 50 ml, che sono state agitate per qualche minuto allo scopo di favorire lo scioglimento della CO_2 ;

- una volta che il valore di pressione si era stabilizzato (dopo circa 1-2 minuti) è stata registrata la pressione del gas residuo (PSI_{CH_4}).

La frazione di metano (CH_4 , %) è stata calcolata, supponendo che essa rappresenti la quota maggiore di gas insolubile: $CH_4 = PSI_{CH_4} / PSI_{aria} \times 100$.

Elaborazione statistica

Tutti i dati ottenuti a 72 ore di incubazione sono stati elaborati con l'analisi della varianza (PROC GLM, SAS 2000) per testare statisticamente l'influenza delle caratteristiche nutrizionali [$i = 10$ (0.070), 13 (0.064) e 15 (0.058), contenuto in PG e rapporto UFL/PG] e della fonte azotata ($j =$ favino e soia f.e.) delle diete secondo il modello:

$$y_{ijk} = \mu + CN_i + FA_j + (CN * FA)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove y rappresenta il singolo dato sperimentale, μ la media generale, CN l'effetto delle caratteristiche nutrizionali delle diete, FA l'effetto della fonte azotata, $CN * FA$ l'interazione di primo ordine ed ε l'errore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Cinetiche di fermentazione

Le figure 1 e 2 illustrano gli andamenti dei processi fermentativi relativi alle sei diete incubate. Per quanto riguarda la produzione di gas è possibile notare che le diete contenenti favino hanno fatto registrare una produzione di gas sempre superiore rispetto a quelle con la soia f.e., ed in particolare la FD_15 è stata quella che ha prodotto più gas in assoluto nell'arco di tutto il processo fermentativo. La dieta FD_13, invece, fino a 36 ore di incubazione segue l'andamento delle diete a base di soia f.e., successivamente accelera il processo fermentativo. L'andamento della velocità di fermentazione appare simile in tutte le diete testate: il processo parte molto rapidamente, raggiungendo la velocità massima (R_{max} media: 12.05 ± 0.81 ml/h) intorno alle 4 ore (t_{max} medio: 3.63 ± 1.02 h) e risulta in gran parte compiuto dopo 36 ore di incubazione, a questo tempo la velocità di tutti i substrati è molto bassa. FD_15 ha fatto registrare valori sempre più elevati di velocità di fermentazione rispetto a tutte le altre diete. Sicuramente le diverse caratteristiche delle diete e soprattutto il loro contenuto in carboidrati strutturali ha

influenzato tali risultati (NDF, % s.s.: 40.49, 30.41 e 24.05 per FD_10, FD_13 e FD_15, rispettivamente; 44.22, 35.22 e 30.84 per SD_10, SD_13 e SD_15, rispettivamente).

Caratteristiche di fermentazione a 72 ore

In tabella 2 sono riportati i parametri di fermentazione *in vitro* ottenuti dopo 72 ore di incubazione. Dall'analisi dei dati emerge che la fonte azotata ha influenzato in modo altamente significativo ($P > 0.001$) la dSO, la produzione gas, di CH₄, di NH₃ e di acido butirrico. In particolare, le diete a base di favino, rispetto a quelle a base di soia f.e. hanno mostrato:

- una maggiore ($P < 0.01$) degradabilità della sostanza organica in tutte e tre le formulazioni (dSO: 73.2 vs. 69.8 %, per FD e SD, rispettivamente);
- una più elevata ($P < 0.01$) produzione di gas (VCSO: 310 vs. 284 ml/g, per FD e SD, rispettivamente), di acido butirrico (10.4 vs. 8.59 mM/g), di AGV totali (96 vs. 84 mM/g) e di NH₃ (44.5 vs. 39.3 mg/g);
- una più contenuta ($P < 0.01$) produzione di metano (115 vs. 138 mM/g);
- valori simili di acido acetico (45.9 vs. 40.7 mM/g) e sovrapponibili di acido propionico (27.3 vs. 27.5 mM/g); questi ultimi, non in linea con la diversa produzione di CH₄, diversamente da come riportato da altri autori (Johnson e Johnson, 1995).

Come atteso, con entrambe le fonti proteiche, la degradabilità e la quantità di gas prodotto sono cresciute in maniera direttamente proporzionale all'aumentare della quota di proteine nelle diete e di energia nelle diete. A testimonianza di ciò, la concentrazione di AGV a catena ramificata, isovalerianico e valerianico, derivanti dalla deaminazione di alcuni aminoacidi, valina e prolina, (McDonald et al., 2002) aumenta proporzionalmente al contenuto in PG delle diete, con entrambe le leguminose: isovalerianico 2.78, 3.06 e 3.30 mM/g e valerianico 1.75, 2.53 e 2.62 mM/g, rispettivamente per PG 10, 13 e 15%.

La quantità di ammoniaca, il principale prodotto della degradazione proteica, misurata alla fine delle fermentazioni non ha mostrato un andamento crescente in maniera lineare in funzione della quota di proteine nelle diete. La dieta al 10 % in tutti e due i casi è quella che ha dato valori più alti di quella al 13 %.

Produzione di metano

Nelle figure 3 e 4 viene illustrato l'andamento della produzione di metano (ml/g di s.s. incubata) nelle diete a base di favino e soia f.e., rispettivamente. In tutte le diete, la produzione di metano sembra essere più veloce nelle prime 24 ore, successivamente continua in modo più rallentato per completarsi quasi del tutto a 48 ore. Da questi andamenti emerge anche che una maggiore quota di metano è prodotta nelle diete contenenti favino rispetto a quelle in cui è presente la soia f.e. Nell'ambito della stessa fonte azotata la maggiore produzione di CH₄ si è ottenuta nel favino con dieta FD_13 e nella soia f.e. con la dieta SD_15.

Rapportando il metano prodotto alla sostanza organica degradata (figura 5), le diete con favino producono sempre più metano rispetto alle analoghe diete in cui è stata utilizzata la soia f.e.; ma la differenza tra le due fonti proteiche si riducono.

A fronte della maggiore produzione di metano il favino ha favorito anche una maggiore produzione di AGV (tabella 2) in linea con un più intenso processo fermentativo che ha comportato un maggiore degradabilità della sostanza organica e una maggiore produzione di gas. Il rapporto (Acetato + Butirrato) / Propionato è risultato più elevato nelle diete con favino in linea con la maggiore produzione di gas metano.

Tra le diete con favino quella al 15 % di proteine ha presentato la produzione minore di metano e la maggiore quantità di AGV, nonché la maggiore degradabilità della sostanza organica. Per quanto concerne la soia la dieta al 13 % di proteine ha presentato la minore produzione di gas metano, ed una produzione di AGV di poco inferiore al valore massimo.

Anche studi *in vivo* confermano la validità dell'impiego del favino come fonte proteica alternativa alla soia: in particolare Cutrignelli et al. (2008a e 2008b) riportano che rispetto alla soia il favino non ha influenzato sostanzialmente le caratteristiche nutrizionali della carne di vitelloni di razza Marchigiana. Pacelli et al. (2007) evidenziano che la sostituzione della quota proteica apportata dalla soia con favino (circa il 23%), malgrado modifichi lievemente l'assetto metabolico dei soggetti, ha prodotto risultati simili in termini di *performance* in vita nell'allevamento biologico del vitellone Podolico. Olivetti et al. (2008) riportano che la sostituzione della soia con una miscela di favino e pisello proteico in bovine da latte a medio-bassa produttività non ha prodotto alcun effetto negativo sulla produttività quanti-qualitativa del latte, la dieta favino-pisello, inoltre, ha prodotto anche latte più proteico e meno ricco di cellule

somatiche; il rendimento delle proteine alimentari in proteine del latte è risultato paragonabile tra le due diete.

L'utilizzazione di proteaginose come il pisello ed il favino, in alternativa alla soia, comunque, sembra utile anche in diete per bovine altamente produttive (Martini et al., 2005); infatti, il vantaggio della soia e delle sue caratteristiche nutrizionali sembra essere più rilevante solo nella prima parte della lattazione, mentre il favino unito al pisello assicura sempre un tenore di proteina più alto.

CONCLUSIONI

In questo contributo, lo scopo è stato quello di valutare il favino in relazione alla soia per cui sono state ideate due ipotetiche diete con contenuto di proteina grezza e valore nutritivo simile; utilizzando due materie prime fisse di base (paglia di frumento e granella di mais) per evitare interazioni diverse con le due fonti proteiche; a conseguenza di ciò alcuni parametri (vedi NDF) sono risultati in qualche caso differenti. Quanto premesso, sembra interessante evidenziare la maggiore produzione di gas metano e di acidi grassi volatili da parte della dieta favino vs. la dieta soia f.e.. La maggiore quantità di gas serra è sicuramente un fatto negativo, ma positiva risulta la maggiore produzione di AGV per l'elevato contributo al soddisfacimento del fabbisogno energetico nel ruminante. Il giudizio complessivo rispetto alle fonti azotate risulta quindi essere un compromesso tra le valutazioni dei due parametri. Non a caso la migliore stima di impatto ambientale di una dieta e quindi delle varie materie prime deve essere il rapporto quantità di prodotto ricavato/ quantità di metano emesso.

Alla luce di risultati ottenuti bisogna fare anche alcune considerazioni di ordine metodologico. Nel presente capitolo, il metano a differenza degli altri contributi, non è stato determinato in maniera diretta, ma stimato tramite un metodo chimico, utilizzato più di frequente per la valutazione del biogas e molto difficilmente nel caso di fermentazioni ruminali *in vitro*. Questo metodo semplice ed economico, è probabilmente affetto da errori che potrebbero sovrastimare il gas serra: si potrebbe verificare che non tutta l'anidride carbonica venga sciolta nella soluzione di idrossido di sodio e, quindi, rientri nella misurazione delle pressioni del gas residuo.; inoltre, il metano, se pur il preponderante, non è l'unico gas di fermentazione che resta insolubile in ambiente alcalino.

Tabella 1.*Caratteristiche nutrizionali delle diete*

Diete	PG	UFL/kg	NDF	NSC	EN/PG	RDP	UDP
	% s.s.		% s.s.	% s.s.		% PG	% PG
FD_10	10.6	0.752	40.49	41.8	0.071	7.65	2.50
FD_13	13.1	0.840	30.41	49.5	0.064	9.86	3.09
FD_15	15.3	0.890	24.05	53.6	0.058	12.11	3.50
SD_10	10.5	0.727	44.22	38.0	0.069	6.11	3.76
SD_13	13.0	0.823	35.22	44.1	0.063	7.65	4.70
SD_15	15.1	0.872	30.84	46.5	0.058	9.00	5.49

FD_10: dieta favino 10% PG; FD_13: dieta favino 13% PG; FD_15: dieta favino 15% PG; SD_10: dieta soia 10% PG; SD_13: dieta soia 13% PG; SD_15: dieta soia 15% PG.

PG: proteine grezza; UFL: unità foraggiere latte; NDF: fibra neutro deterosa; NSC: carboidrati non strutturali; EN: energia netta; RDP: proteine degradabili nel rumine; UDP: proteine indegradabili nel rumine.

Tabella 2.*Parametri di fermentazione in vitro a 72 h nelle diete incubate*

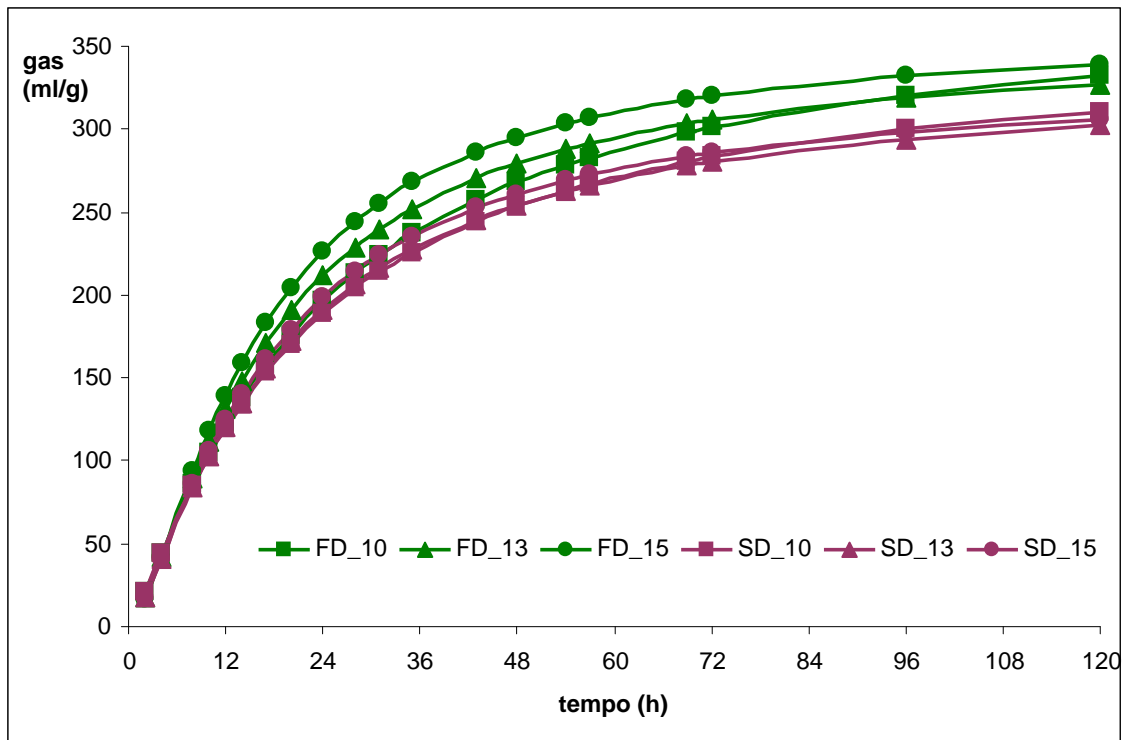
Diete	pH	dSO	VCSO	NH ₃	CH ₄	CH ₄	Acetico	Propionico	Butirrico	tAGV	ABP
		%	ml/g	mg/g	ml/g SSi	ml/g SOd	mM/g	mM/g	mM/g	mM/g	
FD_10	6.21	68.28 ^C	305 ^b	48.21 ^A	95 ^a	139 ^{ab}	42.66 ^{ab}	27.85 ^{ab}	10.19 ^{ab}	88.01	1.90
FD_13	6.20	72.61 ^B	307 ^{ab}	37.90 ^B	107 ^a	148 ^a	42.29 ^b	23.24 ^b	9.59 ^b	97.07	2.31
FD_15	6.22	78.70 ^A	318 ^a	47.42 ^A	93 ^b	118 ^b	52.88 ^a	30.69 ^a	11.40 ^a	103.50	2.12
SD_10	6.20	65.31 ^C	284	37.24 ^A	82 ^b	126 ^a	39.65	25.77	7.68 ^b	80.12	1.84
SD_13	6.23	70.26 ^B	282	35.82 ^B	77 ^b	109 ^b	41.60	28.12	8.68 ^{ab}	85.57	1.78
SD_15	6.23	73.94 ^A	285	44.72 ^A	88 ^{ab}	119 ^{ab}	40.81	28.67	9.42 ^a	86.85	1.75
Var. errore	0.0005	1.86	41.3	2.17	83.0	30.4	31.5	9.14	0.654	79.5	0.089
Effetto CN	NS	***	NS	***	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS
Effetto FA	NS	***	***	***	***	***	NS	NS	***	*	NS
CN*FA	NS	NS	NS	***	***	*	NS	NS	NS	NS	NS

FD_10: dieta favino 10% PG; FD_13: dieta favino 13% PG; FD: dieta favino 15% PG; SD_10: dieta soia 10% PG; SD_13: dieta soia 13% PG; SD_15: dieta soia 15% PG.

dSO: degradabilità della sostanza organica; VCSO: volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza organica incubata; NH₃: ammoniaca; CH₄: metano, rapportato alla SS incubata (SSi) e degradata (SOd); tAGV (mM per litro per g di s.s. incubata): acidi grassi totali (acetico + propionico + butirrico + isobutirrico + valerianico + isovalerianico); ABP: rapporto (acetato + butirrato)/propionato.

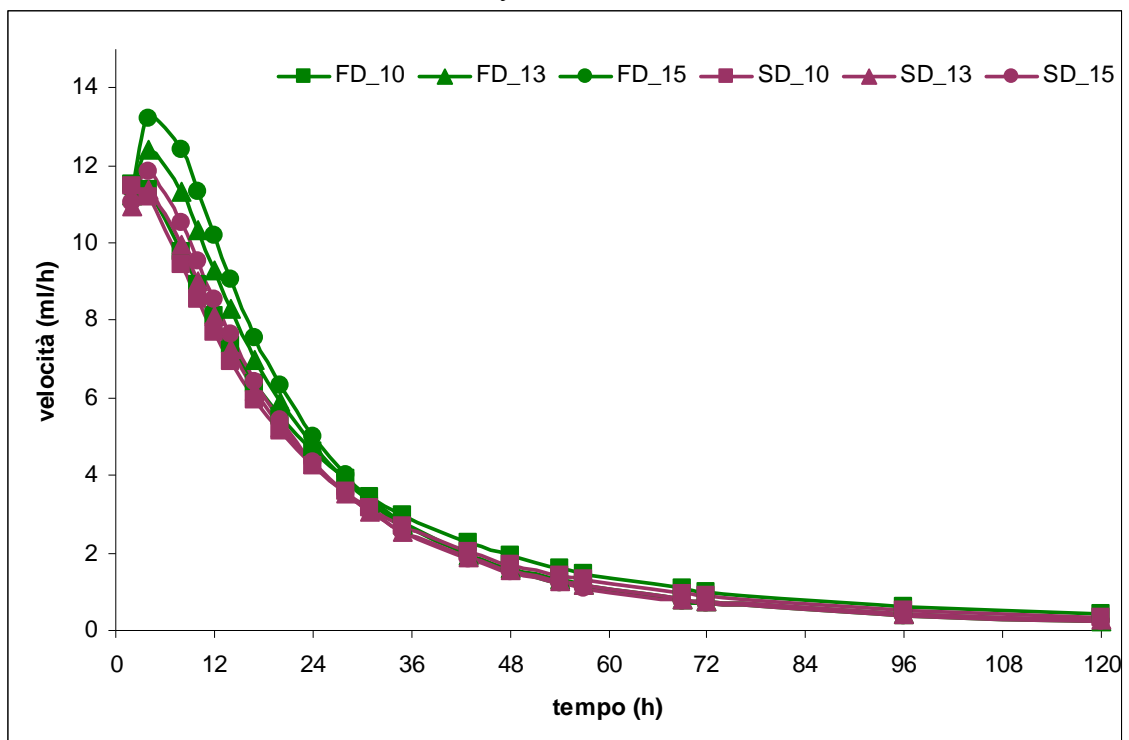
Effetto CN: effetto caratteristiche nutrizionali; effetto FA: effetto fonte azotata. NS, *, ***: non significativo, P < 0.05, P<0.001

Figura 1.
Andamento della produzione di gas nelle diete incubate



FD_10: dieta favino 10% PG; FD_13: dieta favino 13% PG; FD: dieta favino 15% PG; SD_10: dieta soia 10% PG; SD_13: dieta soia 13% PG; SD_15: dieta soia 15% PG.

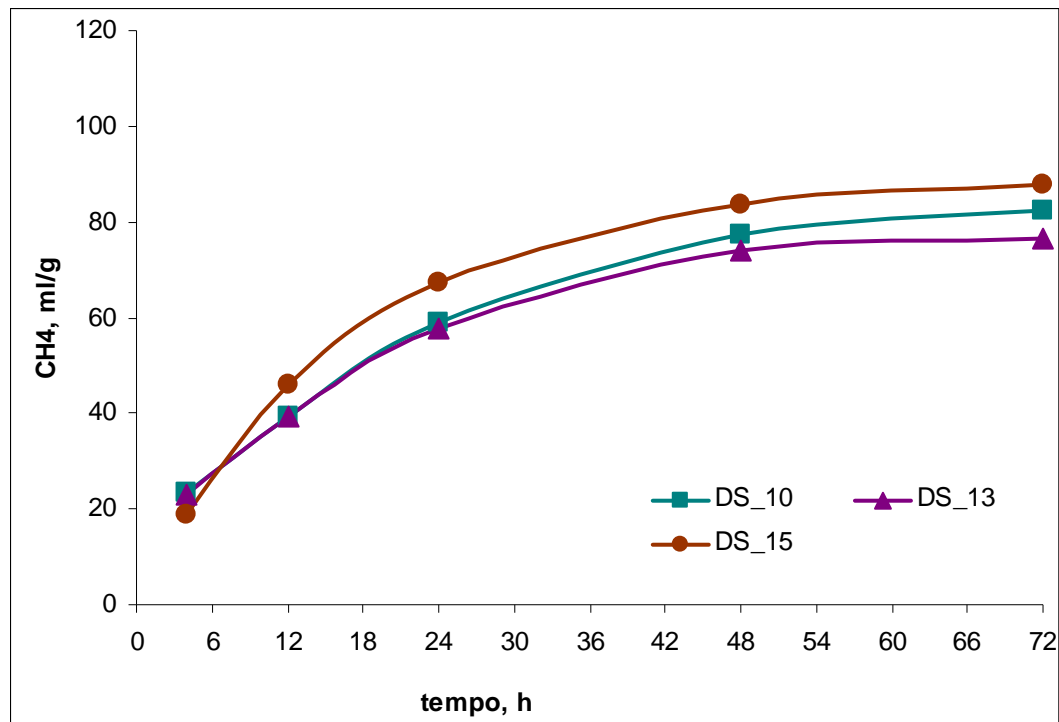
Figura 2.
Andamento della velocità di fermentazione nelle diete incubate



FD_10: dieta favino 10% PG; FD_13: dieta favino 13% PG; FD: dieta favino 15% PG; SD_10: dieta soia 10% PG; SD_13: dieta soia 13% PG; SD_15: dieta soia 15% PG.

Figura 3.

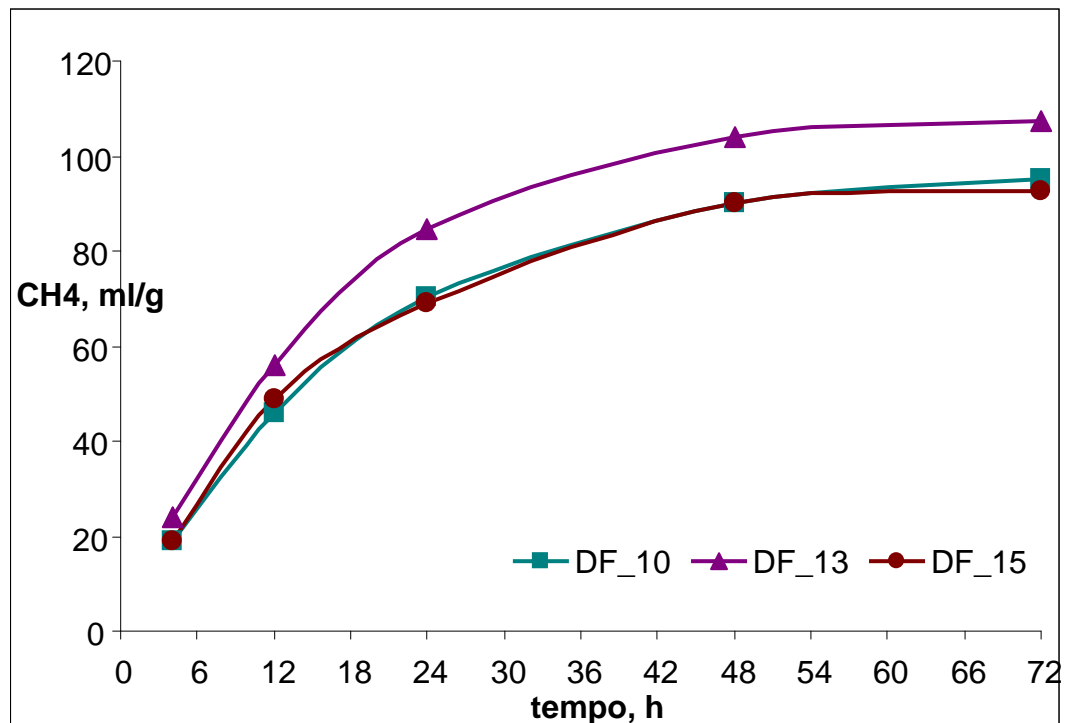
Andamento della produzione di metano nelle diete a base di soia



SD_10: dieta soia 10% PG; SD_13: dieta soia 13% PG; SD_15: dieta soia 15% PG.

Figura 4.

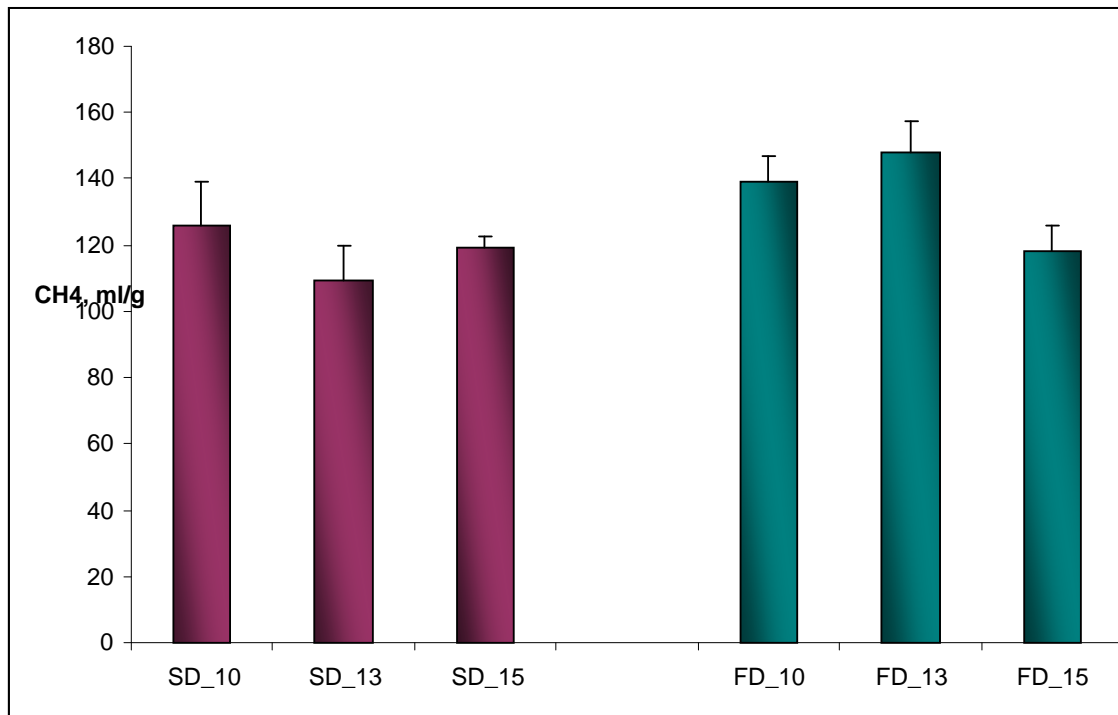
Andamento della produzione di metano nelle diete a base di favino



FD_10: dieta favino 10% PG; FD_13: dieta favino 13% PG; FD: dieta favino 15% PG.

Figura 5.

Metano prodotto a 72 h rapportato alla sostanza organica degradata



FD_10: dieta favino 10% PG; FD_13: dieta favino 13% PG; FD_15: dieta favino 15% PG; SD_10: dieta soia 10% PG; SD_13: dieta soia 13% PG; SD_15: dieta soia 15% PG.

CAPITOLO 4.

Caratterizzazione *in vitro* di un fieno di lupinella raccolto a diversi stadi fenologici

INTRODUZIONE

La lupinella (*Onobrychis viciifolia*), pianta erbacea e perenne, appartenente alle Leguminose (fam. Papilionacee) è ampiamente coltivata in Europa come erba da pascolo. È detta anche Lupinaggione, per la sua somiglianza con la pianta del lupino, e dai Francesi *sain-foin*, fieno santo o, come altri interpretano, fieno sano (Onofrii e Tomasoni, 1989).

Si è diffusa nell'Europa centrale e nell'Asia temperata alcune centinaia di anni fa, ma è diffusa anche in America del Sud e in Sud Africa. Alcune varietà crescono spontanee anche in Italia e, avendo un elevato valore nutritivo, vengono impiegate nella formazione di prati avvicendati di breve durata, sia in pianura che in montagna. È entrata nel novero delle piante agrarie solo da poco; anche se già nel 1640 Parkinson la descrisse come un'erba preziosa in grado di far aumentare la produzione di latte delle vacche.

Mentre trifoglio e erba medica sono stati oggetto di numerosi incroci, la lupinella non ha ricevuto particolari attenzioni in questo senso. Per lungo tempo è stata sottovalutata come coltivazione soprattutto a causa della lenta ricrescita dopo il primo taglio (Kallenbach, 1996). È meno produttiva dell'erba medica: ha il difetto di avere una longevità variabile e di rivegetare in modo stentato dopo il taglio maggengo. Viene quindi coltivata solo per un triennio, utilizzando l'ultimo anno per la produzione della semente.

Clima, terreno e adattamento ambientale della lupinella

La lupinella negli stadi giovanili non sopporta il freddo, ma un impianto affermato resiste a temperature invernali molto basse e manifesta ottima resistenza alla siccità. Infatti, è una pianta particolarmente indicata per ambienti caldi e siccitosi, quali sono

molte zone del nostro Centro-Sud; mal sopporta gli eccessi idrici, anche se temporanei. A questa leguminosa risultano particolarmente confacenti i suoli calcarei, sciolti, magri e con sottosuolo permeabile; cresce bene anche nei terreni ghiaiosi e pietrosi come in quelli argillosi, purché permeabili; rifugge quelli torbosi e granitici e tutti quelli che trattengono acqua. La lupinella è una foraggera che meglio delle altre riesce ad adattarsi e valorizzare i terreni poveri, purché non acidi, sia di collina che di media montagna (Piccioni, 1989).

Figura 1.

La pianta della Lupinella (Onobrychis viciifolia Scop.)



Coltivazione

Generalmente vengono distinti due tipi di lupinella, quella comune (a taglio singolo) e quella gigante (a taglio doppio). La lupinella comune è molto longeva, generalmente raggiunge la massima produzione al terzo-quarto anno, ma è alquanto raro che rimanga molto produttiva oltre i sette-otto anni. Nell'anno di semina resta prostrata, senza la formazione di steli e semi; negli anni successivi fornisce un solo taglio ed il ricaccio viene utilizzato come pascolo. Tra le varietà di lupinella comune si distinguono: Costwold Common, Hampshire Common e Sombourne.

La lupinella gigante cresce più velocemente della comune ed anche nell'anno di semina fornisce un abbondante taglio. Esistono diversi tipi di lupinella gigante, alcuni in grado di fornire ogni anno due-tre tagli apprezzabili. Al tipo gigante appartengono la varietà:

Hampshire Giant e English Giant.

Le differenze tra il tipo comune e il tipo gigante sono dovute soprattutto alla resa in sostanza secca e al periodo di crescita.

La lupinella è particolarmente idonea alla formazione di prati monoliti; viene mantenuta in coltura per due-tre anni, ritenuti il limite minimo per avere una convenienza economica. Nell'avvicendamento sostituisce il trifoglio violetto, con il quale condivide la preparazione del terreno. Entra in rotazioni quadriennali del tipo: lupinella-lupinella-grano-grano (o avena), o quinquennali, con tre anni di lupinella e due di cereale, o anche del tipo: sarchiata-frumento (con lupinella) lupinella-lupinella-frumento.

Lo sviluppo è lento: se è seminata in primavera fornisce un taglio abbondante nel secondo anno di coltura; se seminata in autunno, invece, dà un taglio buono anche l'anno dopo ed uno analogo il successivo.

La lupinella viene raccolta quando è in piena antesi (schiusa del bocciolo durante la fioritura), il ricaccio viene destinato al pascolo. Avendo steli poco acquosi e ricchi di foglie, produce un foraggio alquanto nutritivo che si essicca rapidamente (Onofri e Tomasoni, 1989).

Caratteristiche chimico-nutrizionali

Nella lupinella si evidenziano notevoli differenze di composizione chimica tra il fusto e le foglie. Per queste ultime la composizione, che rimane pressoché invariata dall'inizio fino a piena fioritura, è caratterizzata da un alto contenuto in proteina grezza e in principi minerali. Lo stelo presenta un ben più elevato contenuto in fibra grezza e, con la maturazione della pianta, diminuisce notevolmente il suo contenuto in proteina grezza, grassi e principi minerali.

La produzione di foraggio, di buona appetibilità, digeribilità e non meteorizzante, è fornita da un ottimo primo taglio e da un modesto ributto. Le rese sono di 20-25 t/ha di erba piuttosto acquosa (80% di umidità e più), corrispondenti a 4-5 t/ha circa di fieno, che, tagliato all'inizio della fioritura presenta il 15-16% s.s. di proteine grezze e 0.44 UFL/kg di t.q.. Il valore nutritivo della lupinella non è inferiore a quello della sulla e si avvicina molto a quello del trifoglio pratense e di altre leguminose da foraggio di uso comune (Piccioni, 1989).

Studi sulla lupinella

Negli ultimi anni numerose indagini sono state effettuate, a livello internazionale, per meglio caratterizzare la lupinella, grazie alla scoperta che i tannini in essa contenuti possono interferire in senso negativo sulla produzione di metano a livello ruminale, ridurre la quantità di proteine degradabili a livello ruminale aumentando il flusso duodenale di azoto e avere un effetto antielmintico su alcune parassitosi intestinali (Hoste et al., 2005).

Questo foraggio di leguminosa può essere incluso nella dieta delle lattifere come pascolo, o conservato mediante insilamento o fienagione; la lupinella, infatti, in circostanze simili, si adatta come la medica alla conservazione, sebbene l'irrigazione, le elevate precipitazioni o l'umidità rendono la longevità del fieno di lupinella minore rispetto a quello di medica (Frame et al., 1998).

Si potrebbero ricavare molti vantaggi dall'impiego della lupinella, poiché essa presenta un buon valore nutritivo e la sua proteina è usata in modo molto efficiente; uno dei motivi di questa caratteristica sarebbe da ascrivere alla consistente presenza in essa di tannini (Hedqvist, 2000). Thomson (1982) ha riscontrato un miglioramento dell'assorbimento netto di aminoacidi intestinali nei ruminanti impiegando la lupinella al posto della medica o delle proteine della soia. Contrariamente alla maggior parte degli alimenti che contengono tannini, la lupinella presenta un'elevata appetibilità e ingestione da parte di bovini, ovini ed equini (Griggs e Matches, 1991). Un altro vantaggio dei tannini contenuti nella lupinella è la caratteristica di non provocare alcun rigonfiamento del rumine, questo aspetto risulta molto interessante specialmente per gli animali da latte, che contribuiscono notevolmente all'emissione di metano nell'atmosfera. Infatti, la più efficiente utilizzazione dei nutrienti potrebbe avere una grande influenza sulla produzione di metano (Woodward et al., 2001) ed effetti positivi anche sulle perdite di azoto. Come le altre leguminose, possiede anche la capacità di fissare l'azoto con vantaggi economici ed ambientali per la fertilizzazione.

La lupinella può essere un'ottima coltura da inserire nelle rotazioni colturali; alcune ricerche riportano che cresce in aree che hanno indici di fosforo del suolo molto bassi (Miller e Hoveland, 1995).

Borreani et al. (2002) riportano che la degradabilità della lupinella varia da 770 a 491 g/kg in funzione dell'epoca di crescita; per ottenere un valore nutritivo più elevato, dovrebbe essere sfalciata prima della fioritura. Sebbene la sua degradabilità è minore

rispetto all'erba medica, più elevata risulta l'ingestione di sostanza secca ed uguale o maggiore l'incremento di peso vivo degli animali che la ingeriscono.

Wang et al. (2000) affermano che i livelli moderati di tannini condensati della lupinella migliorano il valore nutritivo del foraggio riducendone la degradazione delle proteine nel rumine, senza ridurre la digeribilità della fibra e l'ingestione volontaria.

Tannini

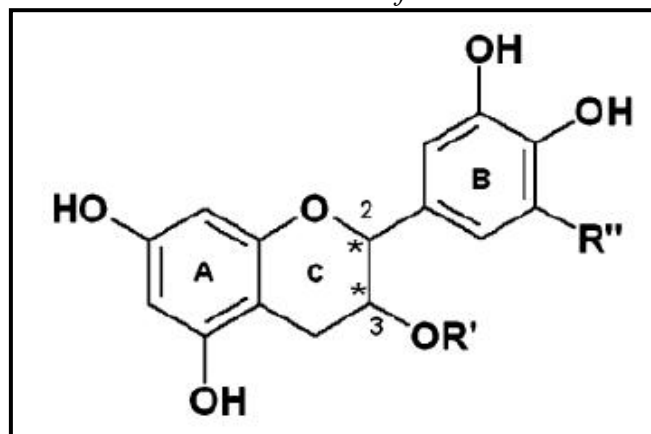
I tannini, composti polifenolici con un peso molecolare che va da 500 a 3000, sono presenti in molti vegetali come composti del metabolismo secondario.

I tannini vengono distinti in due sottogruppi in funzione delle loro caratteristiche chimico-strutturali (Freudenberg, 1922):

- *Tannini idrolizzabili* (HT): hanno un alto peso molecolare e si dividono in gallo-tannini (esteri dell'acido gallico e del glucosio) ed in ellagi-tannini (esteri dell'acido esaidrossidifenico e del glucosio). Sono facilmente idrolizzabili da acidi deboli, e, ad alte temperature, si decompongono dando pirogallolo, un composto epatotossico e fortemente irritante.
- *Tannini condensati* (CT) o flavonoli o proantocianidine: non sono facilmente idrolizzabili, si decompongono in condizioni alcoliche acide dando pigmenti rossi detti flobafeni. La struttura polimerica meglio conosciuta è costituita dai flavan-3-oli (-)-epicatechina e (+)-catechina. Sono fortemente antiossidanti e agiscono in maniera sinergica anche con l'acido ascorbico. I tannini sono molecole presenti in molte specie vegetali in diverse concentrazioni e servono a difendere la pianta dai patogeni e dalle condizioni ambientali sfavorevoli. La proprietà più nota dei tannini è rappresentata dalla loro capacità di legarsi selettivamente alle proteine e altre macromolecole influenzando la disponibilità di queste ultime nella dieta. Infatti, quando i tannini durante l'ingestione vengono a contatto con le proteine di foraggi e concentrati, in ambiente leggermente acido quale quello del rumine, formano dei complessi stabili e insolubili. Nell'intestino, le proteine vengono rilasciate mantenendo inalterato il loro valore biologico e nutritivo. Quindi i tannini possono svolgere il ruolo di trasportatori, rendendo le proteine by-pass.

Figura 2.

Struttura base dei flavonoli



Il complesso tra tannini e proteine dipende dalla dimensione e dalla struttura di entrambi; ad esempio i tannini hanno un'elevata affinità per le proteine con un elevato contenuto di prolina.

Complessivamente, i tannini hanno diverse azioni: antiossidante, anti-mutazione, astringente, anti-microbica e anti-nutrizionale. Le diete per i monogastrici ad alto contenuto di tannini sono in genere associate ad effetti negativi a causa della formazione di legami con i nutrienti, e conseguente diminuzione della loro disponibilità. Esse possono provocare inappetenza, alterazioni della mucosa intestinale e, ad alti livelli tossici, danni in diversi organi.

Nei ruminanti, invece, le diete che contengono moderate concentrazioni di tannini sono associate ad effetti positivi, in quanto proteggono le proteine dalla degradazione microbica e riducono la formazione di schiuma. L'influenza di tannini condensati presenti nella dieta per ruminanti è stata valutata confrontando i risultati ottenuti in animali alimentati con foraggi simili dal punto di vista nutrizionale, ma con diverse concentrazioni dei composti fenolici (Albrecht e Much, 1991). Non è escluso che l'attività antibatterica dei tannini, sia nei ruminanti che nei monogastrici, agisca regolando la microflora del tratto gastro-intestinale in maniera da ottenere effetti positivi.

Tradizionalmente i tannini sono sempre stati considerati solamente come fattori antinutrizionali, per cui raramente sono stati inclusi in diete destinate agli animali zootecnici. Infatti, alcuni studi hanno mostrato che contenuti di tannini superiori al 3% della sostanza secca ingerita possono deprimere l'ingestione, nonché influenzare negativamente la digeribilità dell'intera dieta (Silanikove et al., 1997) con conseguenze negative sulle rese in latte, carne e lana.

Tuttavia, studi svolti negli ultimi anni in diverse parti del mondo considerano invece i tannini sotto un'altra prospettiva, quella di riuscire a ridurre la degradabilità ruminale della proteina nelle diete per ruminanti. In particolare, ricerche condotte in Nuova Zelanda hanno evidenziato che medie concentrazioni di tannini condensati (tra il 2 e il 2,5% sulla s.s.) contenute nel *Lotus corniculatus* migliorano l'utilizzazione proteica, con riduzione delle concentrazioni di ammoniaca nel rumine (-27%) e incremento di assorbimento di aminoacidi essenziali (+50%). Questo ha determinato aumenti nella produzione di latte (+21%), nella crescita della lana (+11%), nell'accrescimento giornaliero (+8%) e nel tasso di ovulazione (+15-30%), senza pregiudicare l'ingestione (Waghorn e Shelton, 1995; Douglas et al., 1995; Wang et al., 1996; Stienezen et al., 1996; Colombari et al. 2005).

Sulla base di queste considerazioni si può concludere che, in diete per vacche da latte, una corretta concentrazione di tannini può migliorarne le performance.

Effetti dei tannini sulla funzionalità ruminale

L'aggiunta di CT ad una dieta per ruminanti ha principalmente il vantaggio di contenere la digestione microbica e quindi, come già detto, di fornire una quantità maggiore di proteine nel post-rumene (Makkar et al., 2003). È ben risaputo anche che i CT diminuiscono la digeribilità ruminale non solo delle proteine, ma anche dei carboidrati ed hanno una pronunciata attività sui batteri che degradano la fibra, mentre il loro effetto sui batteri proteolitici è definito variabile.

McSweeney et al. (1998) hanno osservato in animali alimentati con *Calliandra calothyrsus* (leguminosa ricca in tannini) una considerevole diminuzione della popolazione di *Ruminococcus* spp. e *Fibrobacter* spp. mentre funghi, protozoi e batteri proteolitici non sembrano aver subito analoghi effetti. Sotohy et al. (1997) hanno riportato un consistente effetto riduttivo del numero totale di batteri, proporzionale alla quantità di tannini presenti nella dieta.

Jones et al. (1994) hanno studiato *in vitro* come i CT della lupinella inibiscono l'attività proteolitica dei batteri ruminali: l'attività di *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 e *Streptococcus bovis* 45S1 è stata ridotta rispettivamente del 48% e 92% quando 25 µg/l di CT sono stati aggiunti nel *medium* di crescita; minore influenza è stata osservata su *Prevotella ruminicola* b14 e *Ruminobacter amylophilus* WP225.

Studi condotti per chiarire l'effetto inibitorio di monomeri dei flavonoidi sui microrganismi ruminali, indicano che il numero di gruppi idrossilici sull'anello B

(Figura 2) ne influenza l'attività. Infatti, Lowry (1996) riporta che le gallocatechine con tre gruppi idrossilici sull'anello B inibiscono *Streptococcus*, *Clostridium*, *Proteus*, e *Staphylococcus*. Questa osservazione è coerente con quanto riportato da Molan et al. (2001): i batteri ruminanti vengono inibiti più dai tannini condensati presenti in *Lotus pedunculatus* che da quelli presenti in *Lotus corniculatus*, a causa della loro diversa struttura. Lo stesso autore riporta anche che i legami dei CT con i batteri sono più forti rispetto a quelli CT-substrato. I tannini, inoltre, possono formare dei complessi con gli ioni metallici; a causa dell'alta dipendenza dei sistemi biologici, inclusi i microrganismi, da alcuni ioni metallici, elevate concentrazioni di tannini possono esitare in fenomeni di tossicità.

I ruminanti che ricevono per lungo tempo una dieta ricca in tannini possono sviluppare una microflora tollerante a tali composti. Infatti, per proteggere se stessi contro tali composti, i microrganismi possono mettere in atto una serie di meccanismi, tra cui produrre dei polisaccaridi extracellulari con elevata affinità per i tannini, impedendone il legame con gli enzimi microbici (Scalbert, 1991) o elaborare sistemi enzimatici in grado di degradare i tannini (tannasi) (Lekha, 1997).

Effetto dei tannini sulla produzione di metano

Woodward et al. (2001) hanno riscontrato una riduzione del 24-29% dell'emissione di metano in pecore alimentate con *Lotus pedunculatus*, foraggio contenente CT, rispetto ad altri animali alimentati con loietto ed erba medica.

Un esperimento condotto *in vivo* da Puchala et al. (2005), in cui sono state testate in capre 12 diete differenti per il contenuto in tannini, ha dimostrato che la presenza di maggiori livelli di CT provoca una minore produzione di metano.

Patra et al. (2005), indagando sugli effetti *in vitro* di estratti di piante con un elevato contenuto in metaboliti secondari, hanno riscontrato un'inibizione della metanogenesi solo in presenza di CT e non di altri composti fenolici. Questo risultato conferma la tesi secondo cui l'effetto dei tannini dipende dalla loro struttura chimico-fisica e dalla loro concentrazione nella dieta (Waghorn e McNabb, 2003).

A tal fine andrebbero identificati quali tipi di tannini sono responsabili della formazione del complesso con i batteri.

I maggiori vantaggi dovuti alla presenza di tannini nella lupinella sono quindi riassumibili in:

- maggiore efficienza proteica dovuta alla formazione di complessi solubili o insolubili con le proteine (Albrecht e Much, 1991)
- minore produzione di metano (Waghorn et al., 2002; Puchala et al., 2005)
- prevenzione del meteorismo ruminale e di parassitosi da nematodi (Molan et al., 2001).

Lees et al. (1995) affermano che il contenuto in tannini della lupinella, costituiti da una miscela di procianidina e prodefinidina, varia con la varietà e con lo stadio vegetativo della pianta; Marais et al. (2000) riportano nelle Lupinella una composizione altamente variabile di tali composti.

OBIETTIVO DELLA PROVA

L'obiettivo di questo contributo sperimentale è quello di caratterizzare un fieno di lupinella raccolto a quattro diversi stadi di maturazione della pianta. In particolare sono state verificate, oltre la composizione chimica e il contenuto in tannini (fattori antinutrizionali che interferiscono con l'attività batterica), anche i parametri di fermentazione e la produzione di metano ottenuti *in vitro*. Per la determinazione dei tannini condensati, ci si è avvalsi della collaborazione del gruppo di Nutrizione e Alimentazione Animale della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi della Tuscia (Viterbo).

MATERIALE E METODI

Una prova di fermentazione *in vitro* è stata realizzata impiegando la tecnica della produzione cumulativa di gas (IVGPT), incubando con liquido ruminale bovino per 120 ore, quattro campioni di fieno di lupinella raccolti a quattro stadi fenologici diversi.

Alimenti testati e analisi effettuate

La lupinella (*Onobrychis viciifolia* Scop.) è stata seminata nell'autunno 2007 presso un'azienda agro-zootecnica sita in Sant'Angelo dei Lombardi (AV); nel giugno successivo, sono stati raccolti campioni di foraggio conservati mediante fienagione a diversi stadi fenologici:

1. inizio fioritura con fusti in accrescimento (LUP_1)
2. comparsa dell'infiorescenza (LUP_2)
3. infiorescenza senza fiori aperti (LUP_3)
4. fine fioritura con comparsa dei semi (LUP_4)

Immediatamente dopo il prelievo, tutti i foraggi sono stati sigillati in buste di carta, e trasportati presso il laboratorio "Analisi degli alimenti" del Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti dove sono stati macinati con griglia 1 mm mediante mulino Brabender (Wiley mill, Brabender OHG, Duisburg, Germany). Successivamente sono stati analizzati per la composizione chimica seguendo lo schema Weende, in accordo con il metodo proposto dalla Commissione Valutazione Alimenti dell'ASPA (1980); il frazionamento dei carboidrati di struttura è stato effettuato secondo quanto riportato da Van Soest et al. (1991).

Determinazione dei tannini condensati

Nei quattro campioni di lupinella sono stati determinati i tannini condensati (CT), utilizzando una metodica colorimetrica che prevede la quantificazione dei composti con spettrofotometria UV.

Tannini condensati

Per questa tipologia di analisi è stata utilizzata la metodica della vanillina acidificata (Burns, 1971). Per la fase di estrazione sono stati utilizzati 3.00 g di campione agitati per 20 minuti in 10 ml di metanolo utilizzando tubi falcon da 15 ml, l'estratto è stato poi centrifugato a 6.500 rpm a temperatura ambiente per 10 minuti. Ad 1 ml di estratto sono

stati addizionati 5 ml di cromogeno fresco costituito da una soluzione di Vanillina (Sigma-Aldrich, Milano) al 5% in una soluzione 1:1 (v/v) di metanolo/HCl (8%); dopo un passaggio in vortex i campioni sono stati incubati a bagnomaria (30°C) per 20 min. La lettura è stata effettuata in spettrofotometro a doppio raggio UV- 1610 (Shimadzu Corporation, Japan) a 500 nm contro bianco (solo metanolo).

Il contenuto in tannini condensati è espresso in catechina equivalenti (CE) e calcolato attraverso una calibrazione effettuata utilizzando soluzioni di catechina a diversa concentrazione: 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml trattati con la stessa metodica di sviluppo già descritta per i campioni.

La concentrazione in tannini è stata ottenuta da quella in CE dividendo per un fattore variabile da 2 a 3 in funzione dell'assorbanza rilevata ($Abs_{500} = 0.2$ e 1.4 , rispettivamente). In ogni caso il risultato è stato espresso in mg/g con le seguenti formule:

$$C.E._{sample} = \frac{C.E. \times 10}{3} \times FD \qquad TANN._{sample} = 1/2 \times \frac{C.E. \times 10}{3} \times FD$$

dove FD è il fattore di diluizione eventualmente applicato all'estratto per adattare l'assorbanza del campione entro il *range* di linearità della calibrazione con la catechina (Price *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 1998).

Caratteristiche di fermentazione *in vitro*

Le caratteristiche di fermentazione dei foraggi sono state studiate mediante IVGPT seguendo la metodica riportata da Calabrò (1999). Essa ha previsto l'incubazione in condizioni di anaerobiosi a 39°C, per 120 ore, dei substrati essiccati e macinati con inoculo costituito da liquido ruminale, a cui è stato aggiunto un *medium* di coltura; la produzione di gas durante il processo fermentativo è stata misurata mediante un sistema manuale costituito da un trasduttore di pressione.

Substrato: sono state preparate due serie di bottiglie: per la prima serie ciascun foraggio è stato pesato ($1.0063 \text{ g} \pm 0.0019$), in tre repliche, in bottiglie da siero da 120 ml. Questa prima serie è stata destinata a determinare i parametri di fermentazione (pH, degradabilità, ammoniacale), la produzione di gas e la cinetica di fermentazione. Per la seconda serie gli stessi substrati sono stati pesati ($1.0130 \text{ g} \pm 0.0086$) in due repliche e sono stati impiegati per quantificare l'anidride carbonica e il metano prodotto a 6, 12,

24 e 48 ore di incubazione mediante gas-cromatografia (GC); agli stessi tempi sono stati determinati gli acidi grassi volatili, oltre ai parametri di fermentazione sopra citati.

Per una descrizione dettagliata delle metodiche riguardanti la preparazione del *medium* e dell'inoculo, la misurazione della produzione di gas e del pH, la determinazione del metano mediante GC, nonché l'analisi degli acidi grassi volatili, si rimanda al capitolo 2.

Determinazione dell'ammoniaca

L'ammoniaca (NH_3) è stata determinata mediante spettrofotometro UV impiegando la metodica proposta da Searle (1984). Secondo il principio di Berthelot (1859) in seguito alla deproteinizzazione l'ammonio presente nel liquido viene trasformato in presenza di fenolo (4-7%), ipoclorito di sodio (0.08-0.11%) e sodio nitroprussiate (0.02%) in una soluzione alcalina di blu-indofenolo. L'intensità del colore blu che si forma è legato alla concentrazione di NH_3 . Il pH ottimale per la reazione è di 11.3 - 11.7.

I campioni di liquido ruminale da analizzare vengono centrifugati in triplo per 10 min. (circa 3000 r/min; 1300 g) e successivamente diluiti 25 volte. Successivamente 1 ml di questa diluizione viene mescolata con 1 ml di TCA (acido tricloro-acetico) e centrifugati per circa 10 min. a 1000 g.

Al campione così preparato vengono aggiunti 10 ml di fenolo, 10 ml di ipoclorito di sodio mescolando nuovamente e posizionando i tubi in un bagnomaria a 37°C per 30 min. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente viene effettuata la lettura in spettrofotometria UV (Helios Gamma, Thermoelectron Corporation) a 623 nm di assorbanza contro acqua e confrontando i risultati con una curva di taratura costruita utilizzando una soluzione standard.

Elaborazione statistica dei dati

Al fine di evidenziare le differenze statistiche tra i quattro substrati incubati, tutti i dati di fermentazione ($n = 12$) ottenuti a 120 ore, relativi ai parametri del modello (A, B, T_{max} , R_{max}), nonché al volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza organica incubata (VCSO, ml/g SO incubata) e alla sostanza organica degradata (Yield, ml/g SO degradata), alla degradabilità della sostanza organica (dSO, %), ai valori di pH, all'ammoniaca (NH_3 , mg/g SO incubata) sono stati elaborati mediante analisi della

varianza utilizzando la procedura GLM del pacchetto statistico SAS (2000) secondo il modello:

$$y_{ij} = \mu + S_i + \varepsilon_{ij}$$

dove y rappresenta il singolo dato sperimentale, μ la media generale, S_i ($i = 1-10$) l'effetto del substrato ed ε l'errore.

Con la stessa procedura statistica sono stati analizzati anche gli analoghi dati ottenuti dopo 48 ore di incubazione, nonché i dati relativi alla produzione di metano (CH_4), rapportato alla sostanza organica incubata (ml/g SOi), degradata (ml/g SOd) e come percentuale sul gas totale prodotto (%).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Composizione chimica

La composizione chimica dei quattro fieni analizzati è riportata in tabella 1. Mediamente il fieno di lupinella presenta un buon contenuto in proteine grezze, discreto tenore in carboidrati strutturali e contenute percentuali di ceneri. Alquanto alto risulta in tutti i campioni il tenore in lignina (ADL), particolarmente elevato nel secondo stadio (LUP_2: 16.6 % s.s.). Il confronto tra i dati ottenuti e quelli ritrovati in bibliografia (Proto et al., 1990; Borreani et al., 2003) non è sempre facile a causa della notevole variabilità di composizione chimica dei foraggi in funzione non solo dell'epoca di raccolta, ma anche delle caratteristiche del terreno, delle condizioni climatiche e della varietà impiegata.

Come atteso, le caratteristiche nutrizionali variano in funzione dello stadio fenologico; in particolare, escludendo il primo stadio, si è osservata una diminuzione delle proteine grezze ed un aumento dei carboidrati strutturali passando dall'inizio alla fine della fioritura.

Tannini condensati

Il contenuto in tannini riscontrati nei campioni di lupinella testati è riportato nella figura 4. Per quanto riguarda i tannini condensati è possibile osservare tre tipologie di foraggi: quello con un contenuto più alto (LUP_2: 31,47 mgCE/g s.s.) corrispondente al secondo taglio della lupinella, quello con un livello di CT intermedio (circa 12 mgCE/g s.s.,

mediamente per LUP_1 e LUP_3), infine un terzo con un contenuto minimo di CT (LUP_4: 5,88 mgCE/g s.s.). 31,47 mg/g di catechine equivalenti. Possiamo quindi concludere che, avanzando lo stadio fenologico il contenuto in tannini nella lupinella testata varia in modo consistente, in particolare aumenta passando da uno stadio più giovane fino alla fioritura, per poi diminuire negli stadi più avanzati. Risultati analoghi sono stati riportati da Koupai-Abyazani et al. (1993), in uno studio sul contenuto in alcuni specifici tannini condensati nelle foglie di lupinella di diversa maturità. Tali risultati sarebbero da ascrivere ad una diversa velocità di sintesi di questi composti.

Caratteristiche di fermentazione *in vitro*

In figura 5 e 6 sono riportate le curve che permettono di comprendere la cinetica relativa alla produzione di gas. LUP_1 e LUP_3 hanno mostrato andamenti sovrapponibili per quanto riguarda la produzione di gas e, insieme a LUP_4, anche per la velocità di fermentazione. LUP_2, invece, sembra avere una fermentazione più lenta inizialmente, ma dopo 48 ore di incubazione accelera il processo fermentativo e raggiunge a 120 ore LUP_1 e LUP_3. Il quarto taglio pur presentando per la velocità massima un valore sovrapponibile a LUP_1 e LUP_3, mostra un rallentamento più precoce e quindi una minore produzione finale di gas (233 ml vs 255ml e 261ml rispettivamente ($P < 0.001$)).

In tabella 2 sono riportate le caratteristiche di fermentazione *in vitro* a 120 ore dei quattro campioni di lupinella; fatta eccezione per il gas rapportato alla sostanza organica degradata (Yield) tutti i parametri considerati sono stati influenzati in modo significativo dai substrati ($P < 0.01$). In particolare, in linea con la composizione chimica, la degradabilità della SO e la produzione di gas sono aumentate dal primo al secondo e terzo stadio, per poi ridursi in modo significativo ($P < 0.001$) nel quarto (dSO: 67.9, 69.3, 69.2 e 62.4 % e VCSO: 255, 261, 259 e 233 ml/g, per LUP_1, LUP_2, LUP_3 e LUP_4, rispettivamente). Per quanto riguarda i parametri cinetici, oltre a quanto già evidenziato nel commento dei grafici, c'è da mettere in evidenza che il campione con un contenuto più alto in tannini ha rallentato in modo statisticamente significativo ($P < 0.01$) il processo fermentativo.

Molto elevata è risultata la correlazione tra i ml di gas e la sostanza organica degradata ($R^2 = 0,9971$; $P < 0.01$; dati non in tabella). La relativa regressione del gas sulla sostanza organica degradata ha evidenziato un valore di b (ml gas/mg SO degradata) pari a 0,39 sovrapponibile al valore riportato da Blummel e Ørskov (1993). In un

precedente lavoro (Calabrò et al., 2001) è stato evidenziato un valore pari a 0,41 ml/mg di NDF degradata.

Il pH si è mantenuto per tutti i campioni su valori normali, ad indicare che il sistema tampone è stato efficiente. Per quanto riguarda la produzione di NH_3 , in linea con il contenuto proteico dei campioni, è aumentata passando da LUP_1 a LUP_3 per poi diminuire in LUP_4 (192 mg/g).

Produzione di metano

L'andamento cumulativo della produzione di metano (rapportato alla sostanza secca incubata) misurato nei quattro campioni di lupinella è illustrato in figura 7. Dopo le prime 6 ore di fermentazione, per tutti i campioni gli andamenti appaiono più chiari:

- LUP_1 produce sempre più CH_4 con velocità maggiore tra 12 e 24 ore;
- LUP_2 produce sempre meno CH_4 con velocità costante (l'andamento è rettilineo);
- LUP_3 e LUP_4 mostrano produzioni di CH_4 iniziali differenti che dopo 24 ore coincidono.

Tuttavia, per tutti i campioni le curve appaiono ancora in crescita, facendo supporre che 48 ore di incubazione non sono state sufficienti per completare i processi fermentativi, e quindi la produzione di metano, ad opera dei microrganismi ruminali.

In figura 8 sono riportati i valori percentuali del metano prodotto sul gas totale ai quattro intervalli di tempo considerati (0-6, 6-12, 12-24, 24-48 h). Per tutti i campioni si nota che la percentuale di CH_4 aumenta progressivamente; nell'intervallo 24-48 ore raggiunge i valori più alti, ad eccezione del campione ricco in CT.

In figura 9 è riportata la produzione cumulativa di metano rapportata alla sostanza organica degradata; anche in questo caso si evidenzia una minore produzione del gas serra nel secondo sfalcio raccolto al momento della comparsa dell'infiorescenza (LUP_2). Sicuramente questo risultato è da ascrivere ad una buona digeribilità di questo campione che presenta una buona distribuzione percentuale di tutte le frazioni glucidiche e proteiche, caratteristica della pianta nei primi stadi vegetativi. Sembra però interessante riportare questo risultato anche al più alto contenuto in polifenoli ma soprattutto in tannini condensati.

In tabella 3 sono riportati i parametri di fermentazione ottenuti *in vitro* dopo 48 ore di incubazione. La quantità di ammoniaca prodotta nella bottiglia di fermentazione è coerente con il tenore in proteine dei campioni, ad esclusione di LUP_2, dove tale valore è inferiore a quello atteso. Quest'ultimo risultato potrebbe essere spiegato con

una minore degradazione proteica favorita dall'alto contenuto in tannini che creano complessi non attaccabili dai microrganismi. Come anche riportato da alcuni autori in studi *in vivo* (Min et al., 2002) e *in vitro* (Jones et al., 1994) i tannini condensati hanno anche la capacità di ridurre la crescita e l'attività dei proteolitici nel rumine. Infatti, i tannini condensati possono ridurre la degradazione principalmente attraverso la formazione dei complessi tannino proteina che riducono la possibilità di azione dei batteri (McSweeney et al., 1999), sebbene la reattività dei CT dipenda dal peso molecolare, dal tipo di struttura terziaria e dal tipo di aminoacidi delle proteine (Min et al., 2003).

L'effetto inibitorio dei tannini interessa anche la degradazione delle frazioni fibrose, anche se in maniera secondaria rispetto alla digestione dell'azoto, come dimostrato da Palmer e McSweeney (2000).

Barry e Manley (1986) in uno studio *in vivo* sugli ovini, concludono che il principale effetto dei CT nel primo stadio vegetativo del *Lotus pedunculatus* è stato quello di aumentare il flusso duodenale di azoto non ammoniacale e causare la riduzione nella digestione ruminale di emicellulose e di pectine, ma non di cellulose. Questo risultato è stato confermato anche in un successivo studio (Barry et al., 1986) sebbene il flusso duodenale sia risultato minore per il secondo stadio vegetativo che per il primo. Quindi, come suggerito da Carulla et al., (2005) l'inibizione della metanogenesi è dovuta alla riduzione della degradazione della fibra che limita la produzione dell'acetato per effetto della riduzione del numero dei cellulolitici (McSweeney et al., 2001) e l'indisponibilità dei composti legati ai tannini (Makkar et al., 1995); senza trascurare l'importanza di un diretto effetto dei CT sui metanogeni stessi (Field et al., 1989).

La produzione di una quota inferiore di metano ed una contemporanea produzione di AGV (tabella 3), può indicare che nonostante un'iniziale riduzione della produzione di gas totale, non c'è un'inibizione delle fermentazioni; *in vivo*, quindi, la minore emissione del gas serra non porterebbe ad una minore energia per l'animale.

Il rapporto tra la presenza di CT e produzione di metano negli altri stadi vegetativi della lupinella incubata sembra meno diretto. Si potrebbe ipotizzare una maggiore quantità di metano prodotto nel quarto campione dovuta ad una minore quantità di CT presenti, ma è da evidenziare, comunque, una più bassa qualità del fieno con l'avanzare dello stadio vegetativo.

La quantità di metano prodotto sarebbe perciò dovuto ad una serie di interazioni tra le caratteristiche nutrizionali, che variano con lo stadio vegetativo e la presenza dei fattori antinutrizionali.

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti in questo esperimento sul fieno di lupinella, possiamo concludere che l'avanzamento dello stadio vegetativo e la presenza di tannini condensati hanno un effetto significativo sulla fermentazione dei carboidrati e la produzione di metano *in vitro*.

Resta da stabilire entro quale limite di impiego questi composti, noti fino a poco tempo fa come fattori antinutrizionali, possano avere un effetto benefico sull'attività dei microrganismi ruminanti e quindi sulle produzioni animali.

L'approfondimento delle caratteristiche nutrizionali e di fermentazione del fieno "sano" di lupinella allo scopo di contenere le emissioni di metano nell'atmosfera, risulta oltretutto interessante.

Tabella 1.

Composizione chimica (% s.s.) del fieno di Lupinella raccolto a quattro stadi fenologici

	LUP_1	LUP_2	LUP_3	LUP_4
Sostanza secca	85.4	85.6	85.3	85.6
Proteine grezze	17.5	21.9	20.7	12.2
Lipidi grezzi	2.23	2.57	2.19	1.90
NDF	44.1	39.1	43.3	51.4
ADF	29.6	25.6	34.6	40.9
ADL	11.91	16.6	13.6	11.3
Emicellulose	14.5	13.5	8.7	10.5
NSC	29.7	28.8	27.2	28.8
Ceneri	6.48	7.66	6.65	5.74

PG: proteine grezze; FG: fibra grezza; NDF: fibra neutro detersa; ADF: fibra acido detersa; ADL: lignina acido detersa; NSC (carboidrati non strutturali): $100 - (PG + \text{ceneri} + EE + NDF)$.

LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

Tabella 2.*Caratteristiche di fermentazione in vitro a 120 h del fieno di Lupinella*

	dSO	VCSO	Yield	A	B	T_{max}	R_{max}	pH	NH₃
	%	ml/g	ml/g	ml/h	h	h	%/h		mg/g
LUP_1	67.91 ^A	255 ^A	375	279 ^A	20.33 ^b	9.82 ^b	8.56 ^a	6.50 ^a	226 ^b
LUP_2	69.30 ^A	261 ^A	377	290 ^A	25.27 ^a	9.56 ^b	7.09 ^b	6.41 ^b	241 ^{ab}
LUP_3	69.16 ^A	259 ^A	375	276 ^A	20.87 ^b	10.7 ^{ab}	8.34 ^a	6.42 ^b	294 ^a
LUP_4	62.38 ^B	233 ^B	374	241 ^B	19.01 ^b	11.6 ^a	8.40 ^a	6.45 ^{ab}	192 ^a
Var. errore	2.07	130	382	114	1.35	6.696	0.346	0.0008	374
Prob. t	0.001	0.0545	0.9975	0.0025	0.0009	0.067	0.0401	0.0197	0.0269

dSO: degradabilità della sostanza organica; VCSO: gas cumulativo rapportato alla SO incubata; Yield: gas cumulativo rapportato alla SO degradata; A: produzione potenziale di gas; B: tempo necessario per la produzione di A/2; t_{max}: tempo a cui si raggiunge la velocità massima; R_{max}: velocità massima di fermentazione; NH₃: ammoniaca.

LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

Lettere diverse lungo la colonna indicano differenze statisticamente significative: a, b, c: P<0.05; A, B, C, D: P<0.01.

Tabella 3.

Parametri determinati dopo 48 ore di fermentazione in vitro del fieno di Lupinella raccolto a quattro stadi fenologici

	pH	NH ₃	tAGV	Acetico	Propionico	Butirrico	ABP	AP	CH ₄	CH ₄	VCSO	dSO
		mg/g SOi	mM/g SS i						ml/g *	ml/g**	ml/g	%
LUP_1	6.28 ^b	121 ^{ab}	85.2	55.3	20.3	5.12	2.99	2.74	51.3	32.7 ^a	177 ^a	66.6 ^a
LUP_2	6.35 ^a	100 ^b	81.5	54.0	19.7	3.60	2.95	2.76	43.6	22.4 ^b	155 ^b	58.1 ^b
LUP_3	6.34 ^a	144 ^a	83.7	56.0	18.0	5.12	3.39	3.10	43.6	28.3 ^{ab}	146 ^b	65.3 ^{ab}
LUP_4	6.32 ^{ab}	94 ^b	73.1	46.5	17.1	4.03	2.98	2.74	51.9	28.7 ^{ab}	151 ^b	57.6 ^b
Var. errore	0.0004	136	54.4	42.4	3.98	0.74	0.186	0.147	12.8	5.10	46.8	5,57
Prob. T	0.680	0.395	0.4580	0.5155	0.4541	0.3189	0.725	0.7537	0.1394	0.0449	0.0357	0.0362

* CH₄: metano rapportato alla s.o. degradata; ** CH₄: metano rapportato alla s.s. incubata.

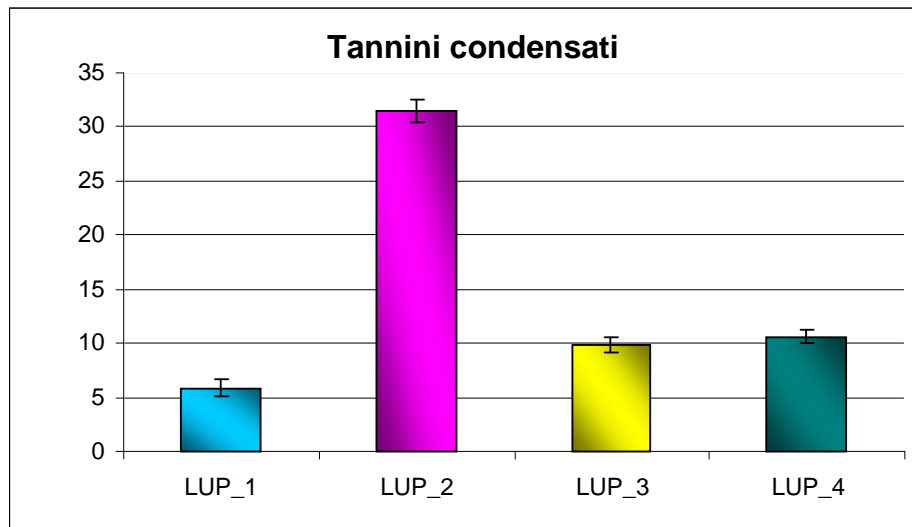
NH₃: ammoniaca; tAGV: acidi grassi volatili totali; (millimoli litro rapportati alla SS incubata) ABP: rapporto(acetato + butirrato)/propinato; AP: rapporto acetato/propinato; VCSO: gas cumulativo rapportato alla SO incubata; dSO: degradabilità della sostanza organica.

LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

Lettere diverse lungo la colonna indicano differenze statisticamente significative: a, b, c: P<0.05

Figura 4.

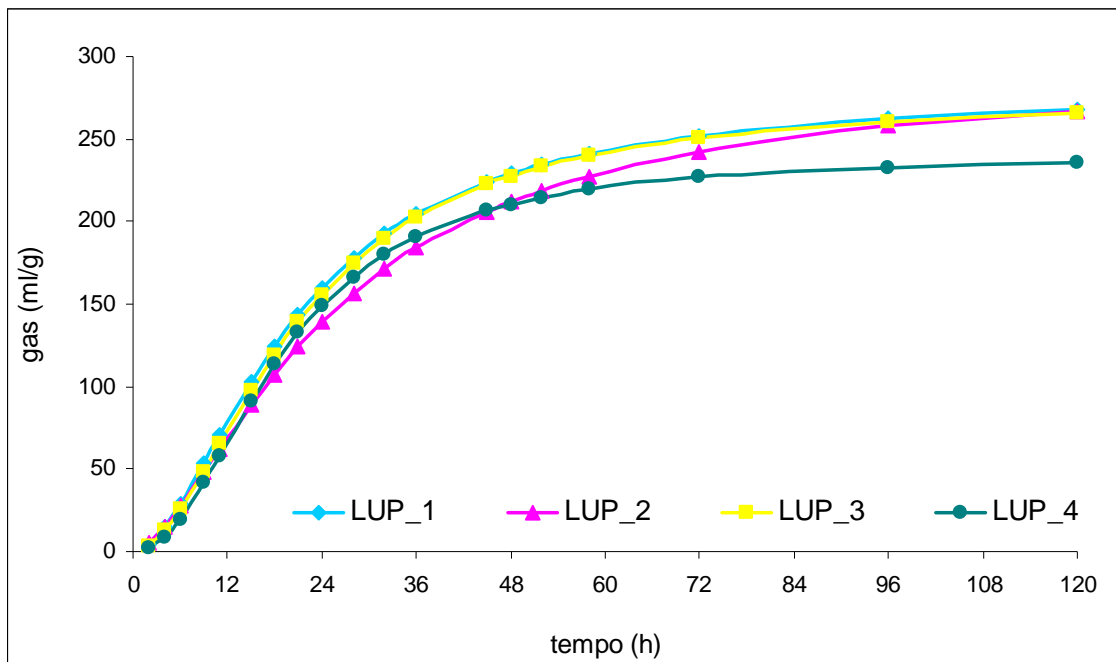
Contenuto in tannini condensati nel fieno di lupinella espresso in CT eq mg/g



LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

Figura 5.

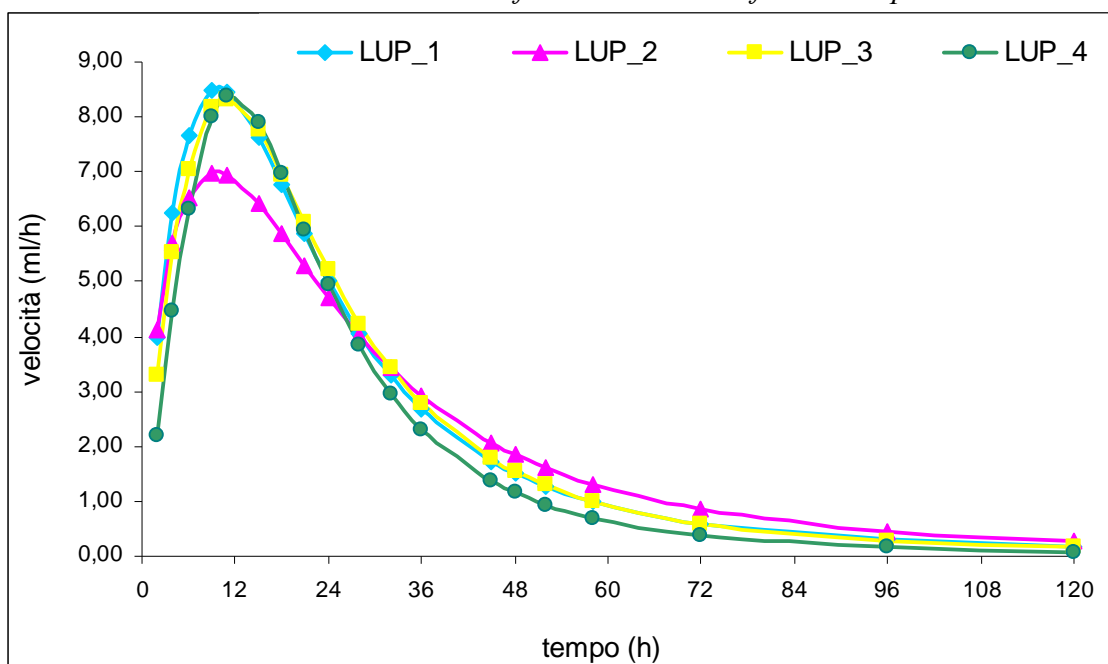
Andamento della produzione di gas (ml/g SOi) nel fieno di lupinella



LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

Figura 6.

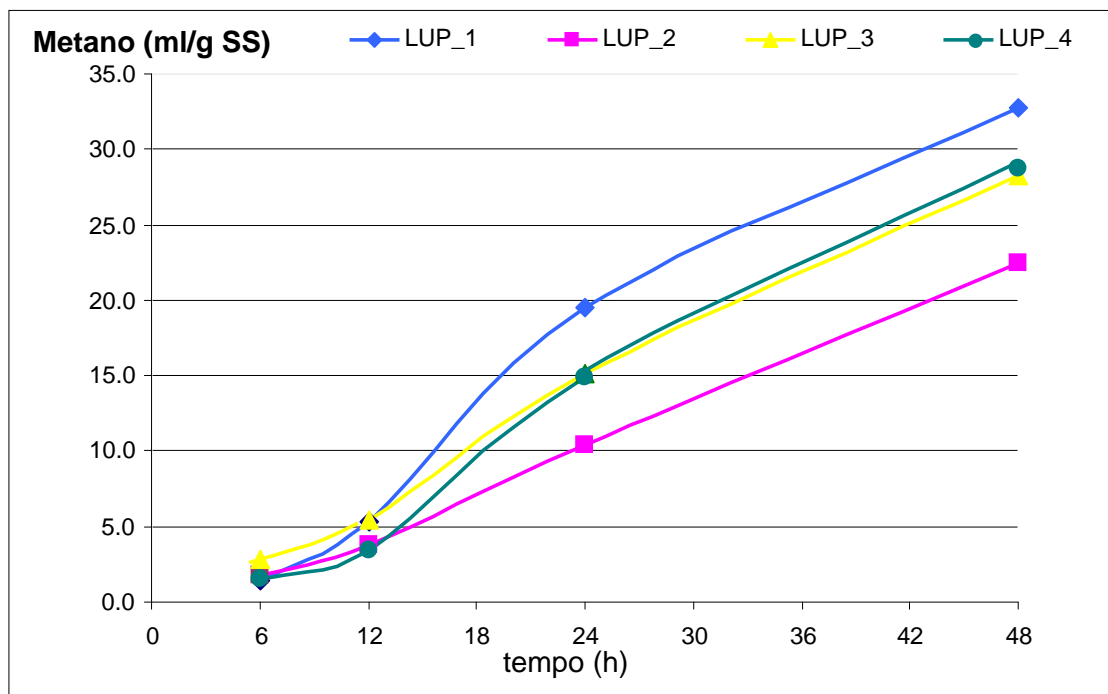
Andamento della velocità di fermentazione nel fieno di Lupinella



LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

Figura 7.

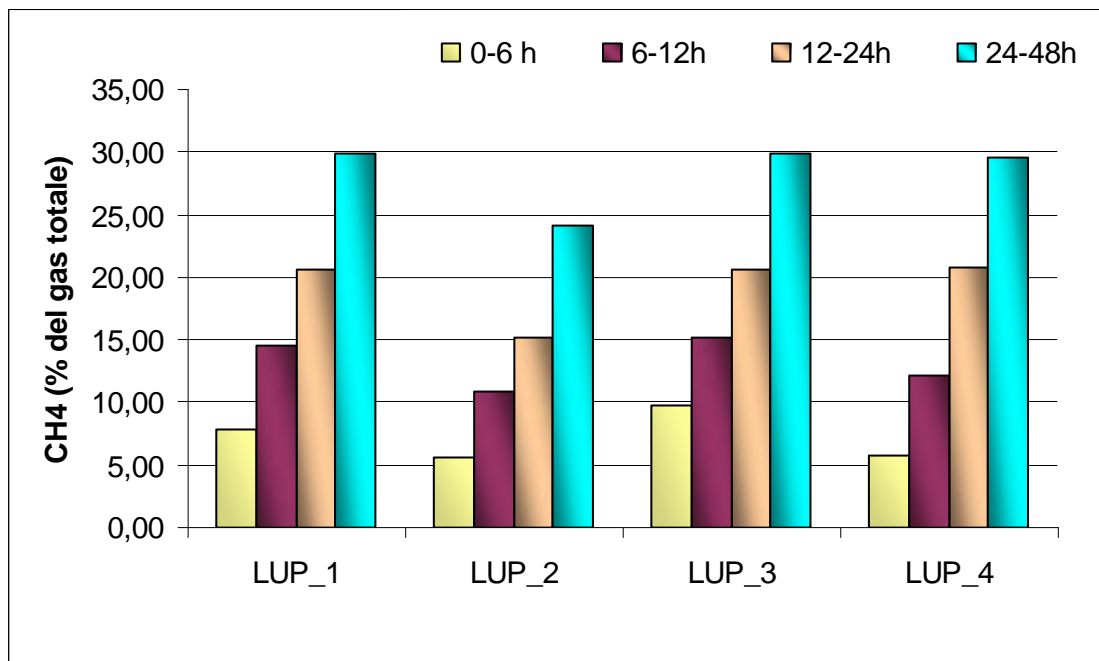
Andamento della produzione cumulativa di metano



LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

Figura 8.

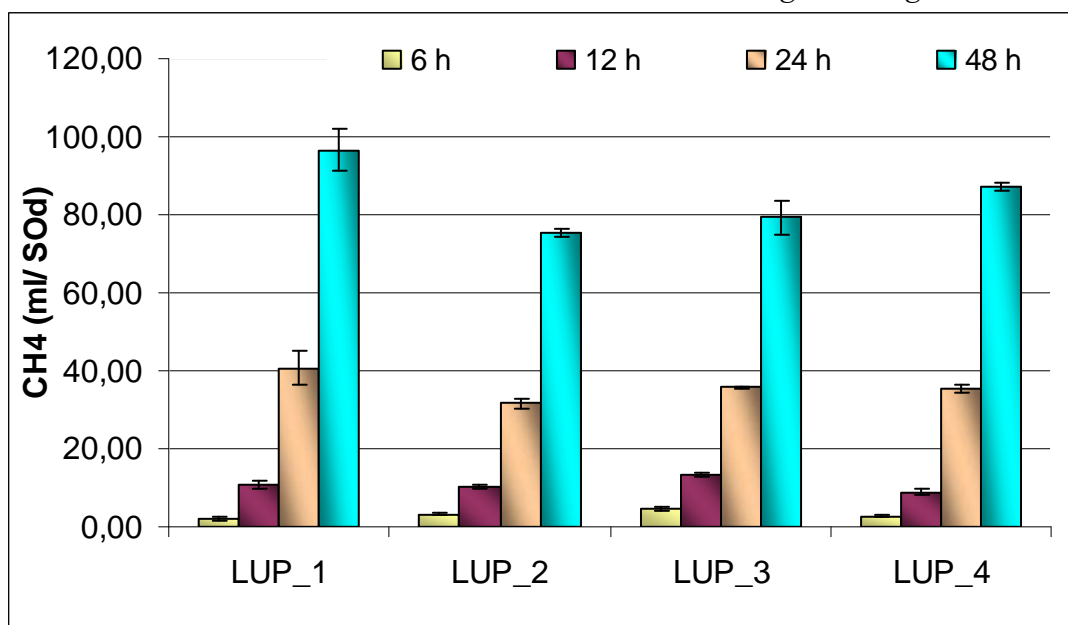
Produzione di metano ai diversi intervalli di incubazione nei campioni di lupinella



LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

Figura 9.

Produzione cumulativa di metano sulla sostanza organica degradata



LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi.

CAPITOLO 5.

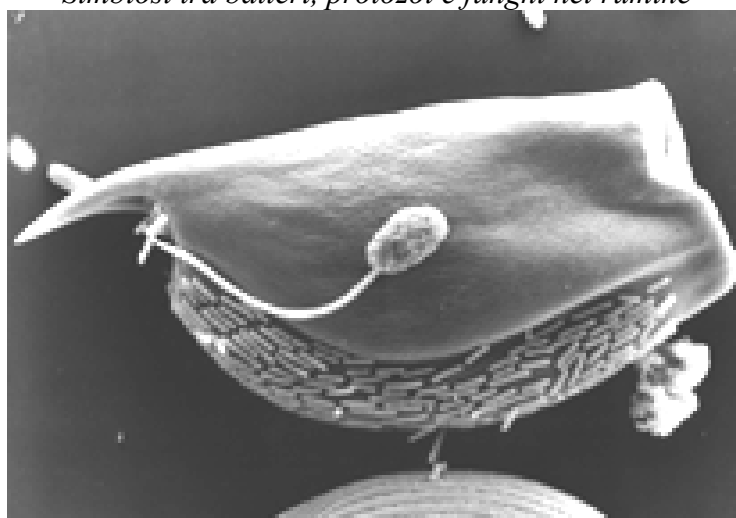
Valutazione *in vivo* di una dieta a base di Lupinella sui microrganismi del rumine

INTRODUZIONE

Il rumine è un complesso ecosistema abitato da diverse popolazioni microbiche che vivono in simbiosi o in competizione tra di loro. L'ecologia microbica ruminale è stata, da oltre mezzo secolo, oggetto di numerose ricerche che hanno sistematicamente descritto le caratteristiche delle principali specie batteriche, protozoarie e fungine presenti nel rumine dei poligastrici.

Con il passare del tempo le tecniche convenzionali basate sui metodi colturali sono state affiancate dalle tecniche di biologia molecolare, nella prospettiva di rendere più rapidi e sensibili i sistemi che consentono di far fronte a modelli di produzione zootecnica che si interfacciano tra una crescente richiesta di prodotti di qualità e principi di sostenibilità ambientale.

Figura 1.
Simbiosi tra batteri, protozoi e funghi nel rumine



Gli Archeobatteri del rumine

I batteri produttori di metano costituiscono un gruppo di microrganismi strettamente anaerobi con caratteristiche così particolari, da essere accomunati in un regno biologico distinto, gli Archeobatteri.

Nel rumine di diverse specie animali sono state identificate sette specie di Archeobatteri rappresentanti cinque generi: *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryanti*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanoculleus olentangi* (Jarvis et al., 2000). I metanogeni sono presenti nel rumine in numero molto variabile ($10^7 - 10^9$ cellule/ml di liquido ruminale), in funzione del tipo di dieta che l'animale riceve, e in particolare dalla quantità di fibra contenuta nella razione (Kamra, 2005).

I metanogeni vivono nel rumine sia liberi che in relazione simbiotica con i protozoi (Fenchel e Finlay, 1995) ma possono anche associarsi ai funghi (Joblin et al., 2002).

In uno studio su bovini (Sharp et al., 1998), che ha previsto l'impiego di sonde molecolari, sono state enumerate e descritte le popolazioni di metanogeni, e la loro associazione con i protozoi. Gli Archea occupavano il 3% delle subunità piccole dell'rRNA e i batteri rappresentavano una percentuale appena sotto il 60%. I metanogeni appartenenti alla fam. *Methanobacteriaceae* sono i più rappresentati, sia nel liquido ruminale (92% degli archea) che nella frazione protozoaria (99%), suggerendo che è possibile trovare questi microrganismi liberi o in associazione simbiotica. I *Methanomicrobiales* contribuiscono a circa il 12% della frazione liquida e non sono associati ai protozoi, mentre i *Methanosarcinales* costituiscono meno del 3% in ambedue le zone (Lange et al., 2005). I membri di alcune famiglie sono del tutto assenti in alcuni ruminanti. Sharp et al. (1998) hanno anche evidenziato che i metanogeni rappresentano la quasi totalità degli Archea nel rumine.

Esaminando le relazioni tra i metanogeni ed altri gruppi di batteri ruminali Morvan et al. (1996) hanno osservato proporzioni equivalenti tra metanogeni e batteri cellulosolitici in tutti i ruminanti studiati, fatta eccezione per i bufali. I metanogeni sembrano comunque costituire la maggior parte della popolazione idrogeno-trofica, mentre i batteri zolfo-riduttori costituiscono sempre gruppi più piccoli, specialmente nei bufali, probabilmente a causa di una minore quantità di solfati negli alimenti.

I metanogeni occupano un ruolo estremamente importante nell'utilizzo dell'idrogeno molecolare derivato dalle fermentazioni ruminali, infatti ne permettono l'eliminazione,

contribuendo a mantenere l'equilibrio simbiotico tra le specie e consentendo così il regolare svolgimento dei processi metabolici.

I protozoi del rumine

I protozoi sono microrganismi eucarioti unicellulari e vengono tassonomicamente compresi nel regno dei Protisti. Rispetto ai batteri, hanno dimensioni più variabili (pochi μm – circa 100 μm di lunghezza) e un metabolismo più esigente; non riescono, infatti, ad utilizzare l'azoto non proteico, per cui necessitano di basi azotate ed amminoacidi, ma anche di acidi grassi e vitamine ed, allo scopo, utilizzano la fagocitosi di batteri.

Nel rumine i protozoi assumono un'importanza rilevante nel processo di degradazione e di fermentazione e, quindi, nella nutrizione dell'animale ospite; in particolare, utilizzano parte dei prodotti della digestione per la loro crescita, e i prodotti rimanenti, principalmente amminoacidi, vengono utilizzati dai batteri o restano liberi nel liquido ruminale.

I protozoi compaiono nel rumine non prima della seconda settimana di vita del vitello, in quanto la loro possibilità di sopravvivenza dipende dalla presenza di batteri e funghi, che sono per questi microrganismi la principale fonte alimentare (i protozoi possono inglobare circa 200 cellule batteriche/min.). Come i batteri, anche i protozoi vivono liberi nella fase liquida del rumine, attaccati alle particelle di alimento o alla parete del rumine.

La loro densità varia in funzione della dieta, del tempo di ritenzione dell'alimento nel rumine, del tipo e del numero di pasti giornalieri e delle condizioni fisico-chimiche dell'ambiente ruminale. Il numero massimo di protozoi si raggiunge con una dieta ricca in fibra, mentre con una dieta a base di concentrati il numero di protozoi diminuisce fino alla completa scomparsa di alcune specie. La quantità di protozoi varia giornalmente anche a causa di fenomeni di sequestro sulla parete del reticolo con successiva migrazione chemio-tattica nel rumine al momento del pasto, in risposta alla disponibilità di glucidi solubili. Alla variazione giornaliera del numero di protozoi, prima e dopo il pasto, concorrono anche:

- la semplice diluizione, a seguito dell'aumento di volume del contenuto ruminale durante il pasto o per l'assunzione di acqua
- il verificarsi di processi di divisione, morte e lisi cellulare
- il passaggio dei protozoi in altri distretti del canale digerente.

La concentrazione di protozoi nel rumine è minima prima del pasto, aumenta di circa 9 volte dal momento del pasto fino a 40 minuti dopo, inizia a diminuire dopo 4 ore e torna ai valori di partenza dopo 6-8 ore (Mariani e Podestà, 1996).

Nel rumine i protozoi sono per la maggior parte ciliati ($10^5 - 10^8$ cellule/ml), ma, in minor misura, si possono trovare anche protozoi flagellati. La classe dei ciliati comprende due ordini, distinti sulla base di caratteristiche morfologiche differenti (Williams e Coleman, 2002):

- 1) *Trichostomatida* o *Holotricha*: presentano una membrana flessibile la quale, nella maggior parte delle specie, è quasi completamente ricoperta da una ciliatura somatica completa ed uniforme;
- 2) *Entodinomorphida* o *Oligotricha*: caratterizzati dalla presenza di una rigida membrana e di ciliatura somatica ridotta, a bande o ciuffi, con ciglia situate solo sul peristoma (solco a spirale diretto fino all'apertura del canale nutritivo).

Al primo ordine appartengono tre specie della famiglia Isotrichidae: *Isotricha prostoma*, *Isotricha intestinalis* e *Dasytricha ruminantium*. Tutti i ciliati Entodiniomorfi che vivono nel rumine possono essere inclusi nella famiglia Ophryoscolecidae, che comprende sei sub-famiglie:

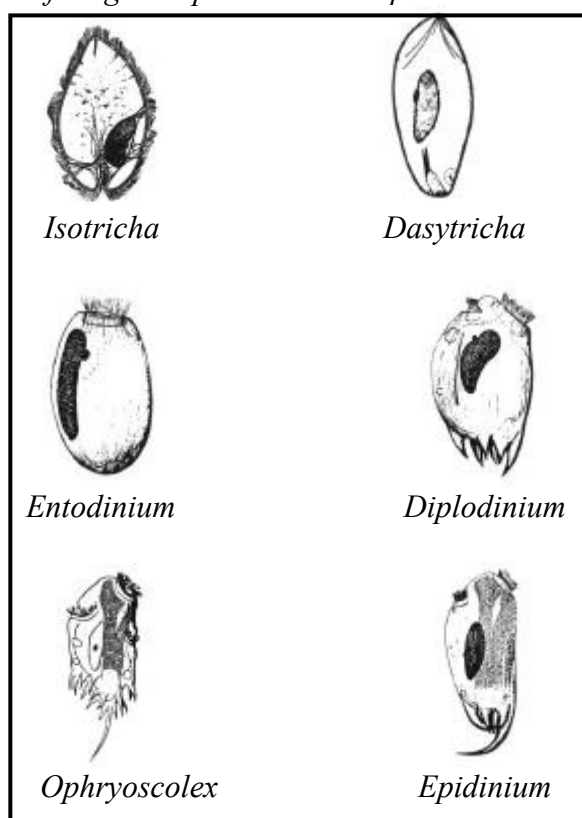
- *Entodininae*, con il solo genere *Entodinium*;
- *Diplodininae*, con sette generi: *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Enaploplastron*, *Metadinium*, *Elystroplastron*, *Polyplastron*;
- *Epidininae*, con due generi: *Epidinium* ed *Epiplastron*;
- *Opistrottrichinae*, con il solo genere *Opistrottrichum*;
- *Ophryoscolecinae*, con il solo genere *Ophryoscolex*;
- *Caloscolecinae*, con il genere *Caloscolex*.

Il rumine ha una temperatura di 39°C e un basso potenziale di ossido-riduzione (sebbene ci possa essere ossigeno in fase gassosa), ed è ricco di nutrienti tra cui l'amido; durante il pasto sono presenti anche composti solubili come zuccheri e proteine.

Gli Entodiniomorfi sono ben adattati all'ambiente ruminale e all'utilizzo di sostanze in forma di particelle, mentre gli Holotrichi possono utilizzare solo sostanze solubili e sono più ossigeno-tolleranti (Williams e Coleman, 1992).

Figura 2.

Alcune famiglie di protozoi ciliati presenti nel rumine



Il profilo enzimatico degli Holotrichi è caratterizzato dalla presenza di amilasi, invertasi, pectine esterasi e poligalactourunidasasi in quantità sufficientemente abbondanti per utilizzare amido, pectine e zuccheri solubili come fonte di energia. Sono presenti anche enzimi che degradano cellulose ed emicellulose, ma i loro livelli sono veramente bassi se confrontati con quelli degli Entodinomorfi.

I protozoi vivono nel rumine grazie alla predazione di batteri e zoospore fungine, la predazione non è selettiva né specifica, ma avviene con criteri casuali e con un'intensità che dipende dalla concentrazione delle prede.

L'ingombro da parte di protozoi, batteri e particelle alimentari porta ad aumento del tempo di ritenzione degli alimenti nel rumine, con una maggiore degradazione degli stessi ed un loro minore flusso al duodeno. La concentrazione di ammoniaca nel rumine di animali nei quali è presente la popolazione dei protozoi, rispetto a quella di animali defaunati (in cui i protozoi sono stati eliminati usando razioni ricche di cereali o mediante agenti chimici) è considerevolmente superiore in ragione di un'aumentata degradazione proteica ed utilizzazione delle catene carboniose degli amminoacidi, nonché del prolungato tempo di ritenzione dell'alimento nel rumine. Con la

defaunazione del rumine si osserva anche un aumento del flusso di composti azotati nel duodeno.

I protozoi ruminali concorrono alla digeribilità dei costituenti ligno-cellulosici della parete vegetale, grazie ad un'intensa attività degradativa nei confronti di alcuni polisaccaridi vegetali e attraverso l'influenza che esercitano sulla popolazione batterica. In loro assenza, infatti, la crescita batterica non controllata porta a variazioni tanto considerevoli delle condizioni chimico-fisiche del rumine da risultare pregiudizievoli per la sopravvivenza degli stessi batteri; con l'ingombro batterico, inoltre, si riduce la quantità di amilopectine, amido, oligosaccaridi e monosaccaridi fondamentali substrati per la fermentazione dei lattobacilli.

La presenza di protozoi influisce anche sul destino finale delle catene carboniose di origine glucidica; i principali prodotti del metabolismo ossidativo protozoario nel rumine sono lattato, acetato, butirrato, anidride carbonica e idrogeno molecolare. Il rapporto molare fra butirrato e propionato prodotti a seguito delle fermentazioni ruminali, pari a 1.7 in presenza di protozoi, passa a 0.5 in loro assenza, mentre la quantità totale di acidi grassi volatili aumenta. Nonostante un'elevata disponibilità di propionato favorisca l'accrescimento somatico dell'animale, i risultati ottenuti dalla defaunazione sulle performance dell'animale sono stati contraddittori, come ci si poteva attendere del resto, considerando quanto articolate e complesse siano le interazioni fra le varie specie microbiche nel rumine (Mariani e Podestà, 1996).

I protozoi possiedono anche enzimi in grado di idrogenare acidi grassi insaturi e organuli respiratori con produzione di idrogeno molecolare (idrogenosomi).

Gli effetti della defaunazione sulle performance animali possono essere così riassunti:

- il pH del rumine è instabile, e vengono rilevati valori bassi (Santra et al., 1994);
- i livelli di acido lattico e acido propionico aumentano (Newbold et al., 1997);
- l'azoto ammoniacale diminuisce in modo significativo (Ushida et al., 1989);
- la metanogenesi è considerevolmente ridotta (Santra et al., 1995).

Associazione tra protozoi e metanobatteri

Una stretta associazione tra metanobatteri e protozoi è stata messa in evidenza da diversi ricercatori (Demeyer, 1981; Jouany et al., 1988). Ben undici specie di protozoi entodiniomorfi hanno batteri che vivono adesi alla loro parete, tra questi *Entodinium longinucleatum*, *Eudiplodinium maggii* e *Eremoplastron bovis* (Stumm et al., 1982). I

batteri possono essere situati sulla superficie cellulare o nella matrice citoplasmatica dei ciliati ruminanti, determinando così una relazione simbiotica tra le due classi di microrganismi (Vogels et al., 1980), che influenza la produzione di metano di origine ruminale. Infatti, i protozoi producono idrogeno che viene successivamente utilizzato dai batteri per la formazione del metano (Williams e Coleman, 1988).

Modificare la microflora del rumine potrebbe essere un modo per contenere la produzione di metano, ad esempio con la defaunazione si può cercare di alterare anche il numero di metanogeni presenti, con una riduzione del metano fino 45% (Jouany et al., 1988). Allo stesso scopo si possono utilizzare anche antibiotici o additivi chimici; esistono anche alcune sostanze vegetali che hanno effetto sulla presenza e sull'attività dei protozoi. La defaunazione porta anche ad un flusso maggiore di proteina batterica dal rumine al piccolo intestino; si ritiene che, a causa della defaunazione, la proteina dell'alimento venga degradata di meno a livello ruminale, con un flusso più elevato delle stesse verso l'intestino che risulterà in una maggiore efficienza proteica, soprattutto in diete con molte proteine (Jouany et al., 1988). Tuttavia, la defaunazione anche se sembra un metodo efficace, è difficile da attuare su larga scala e non si adatta alle vacche da latte che hanno bisogno di una perfetta e completa funzionalità ruminale (Hegarty, 1999).

Newbold et al. (1995) hanno constatato che solo il 9-25% del metano viene prodotto dai metanogeni attaccati ai protozoi ciliati. Questo dato sembra non essere coerente con quanto affermato da Krumholz et al. (1983), secondo cui i metanogeni attaccati ai protozoi sono il 50%; se così fosse l'altro 50% dovrebbe produrre il restante 75 – 90% del metano. Studi analoghi (Newbold et al., 1995; Hegarty, 1999) hanno osservato che il 37% delle emissioni ruminanti di metano sono direttamente correlate ai metanogeni che vivono sopra o all'interno dei protozoi, ma in assenza dei protozoi le emissioni di metano si riducono del 13%; risultati differenti tra i vari autori sono dovuti essenzialmente alla dieta. Machmuller et al. (2003) ha riscontrato un numero più alto di metanogeni in pecore defaunate, constatando una non fondamentale relazione tra protozoi e metanogeni; Dohme et al. (1999) giungono alla stessa conclusione non riscontrando differenze sull'emissione di metano in animali defaunati e faunati alimentati con diete ricche di olio di cocco. Questi ultimi risultati confermano la maggiore importanza dei batteri rispetto ai protozoi nella metanogenesi. Inoltre, i protozoi possono inglobare i batteri e questi ultimi, vivere all'interno dei primi e mostrare, come nel caso dei metanogeni, pochi segni di lisi anche dopo la predazione

(Newbold et al., 1996).

La riduzione dell'emissione di metano a seguito della defaunazione può essere una conseguenza della riduzione della digestione della sostanza secca e della popolazione dei metanogeni, dell'alterazione degli AGV prodotti e della disponibilità di idrogeno.

Con l'ingestione di alimento, gli animali possono assumere fattori anti-nutrizionali (FAN) normalmente presenti nelle piante (es. tannini, lignina, saponine, limosine), che hanno la funzione di difendere i vegetali dall'azione di microrganismi invasivi. I FAN ingeriti dall'animale possono inibire la crescita e l'attività dei microrganismi ruminanti, determinando una riduzione dei prodotti di fermentazione, e del metano in particolare.

Di recente molto interesse ha riscontrato l'utilizzo dei tannini condensati presenti nella lupinella al fine di modulare la presenza e l'attività microbica ruminale, in particolare quella che porta alla formazione di metano. Negli ultimi anni sono stati realizzati numerosi ed interessanti studi, sia *in vitro* che *in vivo*, finalizzati a valutare le emissioni di metano nell'ambiente da parte dei ruminanti che consumavano foraggi con livelli bassi o moderati di tannini condensati rispetto a quelli con livelli elevati (Roth et al., 2001; Woodward et al., 2001).

Tannini e microrganismi

Il principale evento a seguito dell'aggiunta dei tannini condensati alla dieta è la riduzione della digestione microbica (Makkar et al., 2003), in modo particolare quella proteica. I tannini condensati, infatti, riducono la digeribilità ruminale sia con l'azione diretta sui microrganismi, sia attraverso la formazione di complessi tannino-proteina o, anche se in misura minore, legami con i carboidrati, ma i loro effetti sui batteri sono variabili a seconda della specie batterica.

Come già riportato nel capitolo 4. di questa tesi, diversi autori (Reed, 1995; Molan et al., 2001; Makkar, 2003) hanno studiato come i tannini nei ruminanti influenzino il metabolismo proteico e due sono le possibili ipotesi:

- 1) i complessi tannino-proteine potrebbero proteggere le proteine dalla degradazione microbica nel rumine. Il complesso che si forma, però, non è irreversibile, infatti può essere scisso nell'abomaso quando il pH si abbassa; le proteine, quindi, vengono idrolizzate dagli enzimi endogeni, liberando amminoacidi che vengono assorbiti nel duodeno;
- 2) i tannini, a seconda della loro concentrazione e struttura, potrebbero stimolare o inibire la sintesi proteica da parte dei microrganismi.

Per proteggere se stessi contro i tannini, i microrganismi possono mettere in atto una serie di meccanismi, tra cui produrre polimeri con elevata affinità per i composti polifenolici, impedendone il legame con gli enzimi microbici (Scalbert, 1991).

È stato osservato che i tannini condensati presenti nella lupinella, inibiscono la crescita e l'attività proteasica di *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Streptococcus bovis* legandosi alla loro parete cellulare (Jones et al., 1994).

Studi sull'effetto inibitorio di monomeri dei flavonoidi sui microrganismi indicano che il numero di gruppi idrossilici sull'anello β ne influenza l'attività. Lowry (1996) riporta che le galocatechine con tre gruppi idrossilici sull'anello β inibiscono *Streptococcus*, *Clostridium*, *Proteus*, e *Staphylococcus*. Questa osservazione è coerente con quanto riportato da Molan et al. (2001): i batteri ruminali vengono inibiti più dai tannini condensati presenti in *Lotus pedunculatus* che da quelli presenti in *Lotus corniculatus*, a causa della loro diversa struttura.

OBIETTIVO DELLA PROVA

Il presente contributo è stato realizzato in collaborazione con i ricercatori dei Dipartimenti di Animal Science e Microbiology della Wageningen Agricultural University (Wageningen, Paesi Bassi). La prova sperimentale *in vivo* è stata realizzata nell'ambito di un ampio progetto finanziato dalla Comunità Europea (Marie Curie Research Training Network), denominato “Healty hay” che ha l'obiettivo di rivalutare la lupinella, considerandola una nuova risorsa in una prospettiva di agricoltura sostenibile.

In particolare si è voluto valutare l'effetto *in vivo* di una dieta a base di lupinella, ricca quindi in tannini, su vacche in lattazione, analizzando alcuni aspetti dell'ambiente ruminale (metanogeni, protozoi, produzione di ammoniaca e di acidi grassi volatili).

MATERIALE E METODI

Disegno sperimentale

L'esperimento, condotto per la parte che riguardava la gestione degli animali nell'azienda sperimentale 'Ossenkampen' della Wageningen University (Wageningen, Paesi Bassi), ha visto coinvolte tre vacche Holstein Frisian in lattazione dotate di fistola ruminale. La durata della sperimentazione è stata di 11 settimane e le vacche erano alla loro quinta lattazione, in differenti stadi di lattazione (gg di lattazione: 226 ± 64) e avevano una produzione media di latte pari a 29.4 ± 6.1 kg/d.

Con l'autorizzazione del comitato etico, per le prime due settimane gli animali sono stati alimentati con una dieta di adattamento a base di erba medica (leguminosa non contenente tannini) e la razione è stata loro fornita come unifeed (TMR). Dopo il periodo di adattamento, utilizzato anche come controllo, in quello sperimentale nella razione l'erba medica è stata sostituita con fieno di lupinella (*Onobrychis viciifolia* Scop., varietà Cotswold – Common) e con il loietto (*Lolium perenne*). La composizione chimica dei componenti della dieta è indicata nella tabella 1. Al termine della prova la dieta è stata nuovamente sostituita con l'erba medica.

Al fine di neutralizzare l'effetto dei tannini presenti nella lupinella, durante i primi sei giorni del periodo sperimentale, così come indicato da Woodward et al. (2001), una soluzione di PEG (0.325 kg polietilenglicole PEG400 disciolto in 0.325 kg di acqua) è stata somministrata a ciascun animale attraverso la fistola ruminale per 3 volte al giorno (0,945 kg in totale).

Tabella 1.*Composizione chimica (g/kg) degli ingredienti della razione*

	RST¹	Concentrato	Lupinella + loietto
Sostanza secca	90	90	50
Proteine grezze	28.5	16.7	13.6
Lipidi grezzi	2.3	3.7	3.1
Fibra grezza	6.8	9.6	31.1
Amido	20.5	21.2	-
Ceneri	5.0	7.8	7.5
NDF	-	-	59.0
ADF	-	-	35.0
ADL	-	-	4.0

¹RST= farina di semi di soia tostati (33%), estratto di semi di colza (33%), frumento (33%) e melassa (1%).

Estrazione e determinazione dei composti polifenolici da *Onobrychis Viciifolia*

Per l'estrazione sono stati pesati, in tre replicazioni, 5 g di campione di foraggio essiccato e macinato, e 25 ml di soluzione acquosa fredda di acetone al 70% (1:5 materiale secco:solvente) in tubi da centrifuga, sottoposti poi ad ultrasuoni per 30 min a 4°C. Dopo la centrifugazione (6.000 rpm, 10 min, 4°C) il supernatante di colore chiaro (estratto polifenolico) è stato raccolto e il residuo è stato estratto nuovamente per due volte, ciascuna volta con 13 ml con la soluzione fredda di acetone seguendo le stesse condizioni della prima estrazione. Gli estratti sono stati addizionati e l'acetone è stato rimosso sotto vuoto a 35°C, l'estratto polifenolico concentrato rimanente è stato congelato e conservato in essiccatore sottovuoto fino alle successive analisi. Da 5 g di materiale vegetale è stata ottenuta una polvere giallo-verde (estratto polifenolico) pari a 0.888 g, ovvero il 17,76% dell'estratto totale.

L'analisi dei polifenoli nell'estratto acqua/acetone (10 mg di estratto sono stati disciolti in 100 µl di acqua e centrifugati per 10 min a 10.000 rpm a 4°C) è stata condotta usando un sistema HPLC in fase inversa con un rilevatore DAD (Diode-Array-Detection) in accordo con il metodo indicato da Treutter (1994).

Determinazioni sul liquido ruminale

Il contenuto ruminale è stato campionato secondo il protocollo riportato da Hristov et al. (2001), in particolare, porzioni di materiale solido prelevato da ciascun animale da 4 zone differenti del rumine (porzione apicale, porzione dorsale, porzione ventrale e reticolo) sono state filtrate attraverso un *cheesecloth* per allontanare la parte solida. La frequenza di campionamento per ciascuna dieta è riportata in tabella 2.

Tabella 2.

Frequenza di campionamento del contenuto ruminale

Settimana	Giorno*	Dieta	Frequenza
1 ^a		Erba medica	3 prelievi**
2 ^a		Lupinella + PEG	3 prelievi**
3 ^a	1-5*	Lupinella	5 prelievi
4 ^a	8-12	Lupinella	3 prelievi
5 ^a	15-19	Lupinella	2 prelievi
6 ^a	23	Lupinella	1 prelievo
7 ^a	30	Lupinella	1 prelievo
8 ^a	37	Lupinella	1 prelievo
9 ^a	44	Lupinella	1 prelievo
10 ^a	50	Lupinella	1 prelievo
11 ^a		Erba medica post	2 prelievi**

* i giorni sono contati a partire dalla dieta a base di lupinella

**per l'elaborazione statistica relativamente a questi prelievi sono stati presi in considerazione i valori medi.

Sul materiale liquido raccolto (circa 0.5 l) è stata effettuata la determinazione molecolare quantitativa degli archea, la conta dei protozoi, la determinazione dell'ammoniaca e degli acidi grassi volatili. Il liquido ruminale è stato raccolto dagli animali durante la mattinata prima del primo pasto, dato che, essendo la composizione dei microrganismi del rumine estremamente variabile in relazione all'assunzione dell'alimento, questo è il momento in cui sembra essere più stabile.

Quantificazione molecolare degli Archea

I campioni di liquido ruminale prelevati sono stati filtrati, raccolti in provette Eppendorfs da 1,5 ml e congelati a – 80° C per le successive analisi.

Estrazione del DNA dal liquido ruminale

Il DNA è stato estratto mediante il kit di estrazione Fast DNA SPIN (kit for soil, Q-BIO gene, Quebec, Canada) secondo il seguente protocollo:

- 1,5 ml di liquido ruminale sono stati centrifugati a 12000 g per 3 minuti
- eliminato il supernatante è stato pesato il pellet, per i campioni il cui peso superava i 500 mg, la quantità in eccesso è stata rimossa
- il pellet è stato sospeso in 900 µl di buffer sodio-fosfato e trasferito negli appositi Lysis Matrix E tubes a tenuta compresi nel kit
- sono stati aggiunti 120 µl di MT buffer, per la solubilizzazione delle proteine
- i campioni sono stati trasferiti nel FastPrep®Instrument (Q-BIO gene, Quebec, Canada) e processati per 30 secondi a 5.500 g di velocità; l'operazione è stata ripetuta due volte e raffreddando i campioni nelle pause
- i Lysis Matrix E tubes sono stati centrifugati a 14000 g per 30 secondi, il supernatante trasferito in un nuovo tubo da 1.5 ml insieme a 250 µl di PPS e tutto miscelato per 10 volte manualmente
- un'ulteriore centrifugazione a 14.000 g per 5 minuti ha consentito di separare nuovamente il pellet dal supernatante, e questa volta è stato trasferito in una provetta da 15 ml con 1 ml di Binding Matrix Suspension, precedentemente risospesa.
- l'agitazione del campione per 2 minuti ha consentito alla matrice di legare il DNA, depositatosi una volta posto a 4°C per un tempo superiore a 3 minuti
- una volta eliminati 500 µl di supernatante in eccesso, avendo avuto cura di non danneggiare la matrice, quest'ultima è stata risospesa nella restante quantità di supernatante
- 600 µl della sospensione sono stati trasferiti in un filtro compreso nel kit e centrifugati a 11000 g per 3 minuti; l'operazione è stata ripetuta per la restante parte di liquido
- sono stati aggiunti 500 µl di soluzione di lavaggio SEWS-M al filtro e centrifugati a 14000 g per 3 minuti
- i filtri sono stati trasferiti in un nuovo tubo numerato da 1,5 ml a cui sono stati aggiunti 100 µl di DNase/Pyrogen FreeWater e agitati con il vortex per risospendere la silice per un'efficiente eluizione del DNA, un'ultima centrifugata a 14000 g per 1 minuto ha consentito di recuperare il DNA pronto per l'amplificazione.

Lettura spettrofotometrica

La concentrazione del DNA in ogni campione è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro (Nanodrop spectrophotometer, Thermo scientific) alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm, utilizzando, a 260 nm, un coefficiente di estinzione pari a $\epsilon^{0.1\%} = 20$. Dal rapporto tra i valori dell'assorbanza ottenuta a 260 e 280 nm è stato calcolato anche il grado di purezza rispetto al contenuto di proteine (rapporto ottimale 1.8 - 2.0). I campioni sono stati conservati a -20°C per le successive analisi. Il DNA microbico totale è stato diluito 1:10 prima dell'utilizzo per la real time PCR quantitativa.

Real time PCR quantitativa (qPCR)

Come Primers sono stati usati “*mcrA* forward” e “*mcrR* reverse” per amplificare il gene *mcrA*, impiegato come gene alternativo al 16S RNA nell'analisi filogenetica della popolazione metanogenica.

Primer	Sequenza 5'-3'	Temperatura di annealing (°C)	Lunghezza di amplicone (bp)
<i>qmcrA-F</i>	TTCGGTGGATCDCARAGRGC	60	140
<i>qmcrA-R</i>	GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC		

I primers disegnati per la determinazione degli Archea avevano come target il gene del metil coenzima-M reduttasi (*mcrA*). Il primer *mcrA* forward (*qmcrA-F*) è stato disegnato per codificare la sequenza amminoacidica conservata FGGSQR, mentre il primer reverse (*qmcrA-R*) per la sequenza conservata GFYGYDL. I primers sono stati disegnati per una T_m ottimale di 60°C.

Per limitare qualunque inquinamento dei campioni e dei reagenti si è provveduto ad effettuare tutte le manipolazioni sotto cappa a flusso laminare e ad utilizzare solo reagenti sterili. Le amplificazioni sono state effettuate con l'apparecchio per qPCR Bio-Rad iQ5 Real time PCR Detection System e i dati sono stati elaborati con i software iQ5 Optical System, seguendo il protocollo descritto da Denman et al. 2007.

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti per un volume totale di reazione di 25 μ l:

12,5 μ l di iQTM Sybr[®] Green Supermix (Invitrogen)

0,5 μ l di primers forward (10 μ M)

0,5 μ l di primers reverse (10 μ M)

6,5 μ l acqua bidistillata sterile

5 μ l DNA template

Tutti i campioni di DNA sono stati preparati in triplo, avendo la cura di ridurre al minimo l'errore di pipettaggio, usando piastre da reazione BioRad[®] da 0,2 ml con film plastici idonei alla lettura ottica (MicroAmp[®] Optical, Applied Biosystems). Il protocollo ha previsto i seguenti passaggi termici: 2 min. a 50°C, 2 min. a 95°C, 40 cicli costituiti da 15 sec. a 95°C e 1 min. a 60°C, 1 min. a 95°C.

Costruzione della curva standard

Per la quantificazione degli Archea è stato usato come ceppo di riferimento il *Methanobrevibacter smithii* 861^T fatto crescere per 2-3 giorni a 37°C nel seguente medium:

- 0.5 g KH₂PO₄, 0.4 g MgSO₄, 0.4 g NaCl, 0.05 g CaCl₂ · 2H₂O; 0.002 g, FeSO₄ 7H₂O
- 1 ml di soluzione di microelementi (dettagli descritti in seguito)
- 1 g estratto di lievito, 1 g sodio-acetato, 2 g sodio-formato, 50 ml liquido ruminale (dettagli descritti in seguito), 4 g NaHCO₃, 20 ml miscela di acidi grassi (dettagli descritti in seguito), 0.001 g resazurina, cisteina-HCl·H₂O 0.5 g, 0.5 g Na²S·9 H₂O, 940 ml acqua distillata.

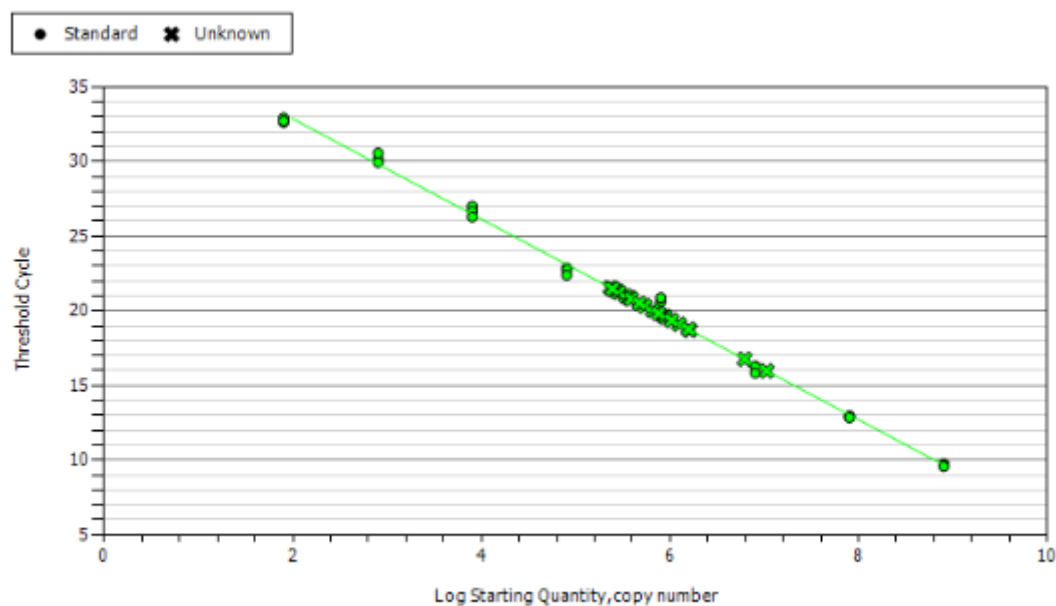
Il pH deve essere corretto a 6.7 - 7.0; il medium è stato preparato anaerobicamente sotto pressione gassosa (80% di H₂ e 20% CO₂).

Soluzione di microelementi: 10 ml HCl (25%; 7.7 M); 1.5g FeCl₂ x 4; 1.5 g H₂O; 70 mg ZnCl₂; 100 mg MnCl₂ x 4 H₂O; 6 mg H₃BO₃; 190 mg CoCl₂ x 6 H₂O; 2 mg CuCl₂ x 2 H₂O; 24 mg NiCl₂ x 6 H₂O; 36 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O; 900 ml di acqua distillata.

Liquido ruminale: 0.4% di estratto di lievito è stato aggiunto al materiale ruminale e successivamente incubato a 37°C per 24 ore; dopo aver centrifugato e autoclavato la soluzione è stata conservata in assenza di luce e a temperature ambiente.

Miscela di acidi grassi: 0,5 g di valerianico; 0,5 g di isovalerianico; 0,5 g di 2-methylbutyrrico; 0,5 g di Isobutirrico; 2 l di acqua distillata, il pH è stato portato a 7.5 con NaOH.

Figura 3.
Curve standard per la quantificazione assoluta degli archea



Fluor	PCR Efficiency (%)	R Squared	Slope	y-Intercept
FAM	98.5	0.997	-3.359	39.576

Successivamente il DNA è stato estratto con il Soil kit sopra descritto e amplificato. In accordo con Luton et al. (2002), sono stati usati i primers “*mcrA* forward” e “*mcrR* reverse” per amplificare il gene *mcrA*.

Primer	Sequenza 5'-3'
<i>mcrA</i>	GGTGGTGTG GATTACACARTAYGCWACAGC
<i>mcrR</i>	TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT

Il protocollo di amplificazione è stato descritto da Innis e Gelfand (1990). La sequenza è stata successivamente purificata con l'utilizzo del kit High Pure PCR Cleanup (Roche, 2008); l'estratto diluito serialmente da 10^8 a 10^0 copie/μl, al fine di costruire una curva di calibrazione per ogni corsa di qPCR.

Conta microscopica dei protozoi

La metodica per la conta del numero dei protozoi ha seguito il protocollo proposto da Dehority (1984). Secondo gli studi di Purser e Moir (1959) ci sono tre importanti fattori da tenere in considerazione nella conta dei protozoi:

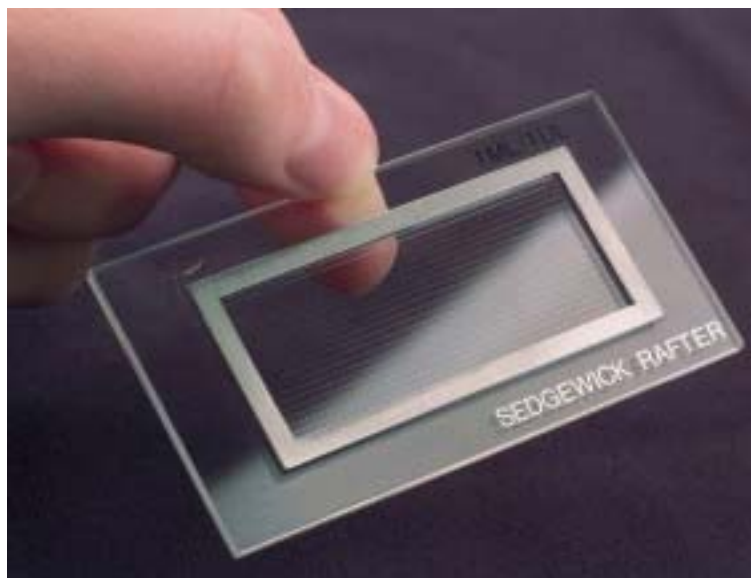
- la camera di conta deve essere sufficientemente profonda per ospitare i protozoi;
- la procedura di caricamento deve garantire una distribuzione uniforme delle cellule nella camera di conta;
- la viscosità del diluente deve essere tale che le cellule restino in sospensione durante lo spipettamento ma che poi si fissino sul fondo della camera di conta entro 5-10 minuti.

In questo studio, la conta dei protozoi è stata effettuata sulla frazione liquida prelevata durante il campionamento del materiale ruminale di ogni animale. È importante sottolineare che il numero totale dei protozoi può essere inferiore nel liquido ruminale rispetto a tutto il contenuto ruminale; tale numero dipende dal momento del campionamento e dalla procedura usata per separare la frazione liquida da quella solida. Per la prova, 10 ml di liquido ruminale filtrato sono stati trasferiti in un cilindro graduato e addizionati con 10 ml di formalina (soluzione al 50% preparata con formaldeide commerciale al 37%) e manualmente agitati; successivamente, sono stati ottenuti 3 sotto-campioni dai quali è stato prelevato 1 ml e trasferito in provette di plastica da 15 ml è stato addizionato con 2 gocce di colorante verde (brilliant green dye); successivamente sono stati mescolati e lasciati a riposo per 24 ore. Trascorso questo tempo, sono stati aggiunti 9 ml di glicerolo al 30%, ottenendo una diluizione pari a 1:20 rispetto al liquido ruminale.

Il campione diluito è stato pipettato con una pipetta Gilson in una camera di conta specifica per protozoi (counting cell Sedgewick-Rafter chamber) riportata in figura 4. La camera di conta ha un'ampiezza di 50 x 20 mm e una profondità di 1 mm, per una capacità totale di 1 ml; il numero totale delle caselle della griglia è di 100 per 1 mm².

Figura 4.

Camera di conta Sedgewick-Rafter



Determinazione dei prodotti di fermentazione

L'ammoniaca (NH_3) è stata determinata mediante spettrofotometro UV (Helios Gamma, Thermo-electron Corporation) impiegando la metodica proposta da Searle (1984). Secondo il principio di Berthelot (1859) in seguito alla deproteinizzazione l'ammonio presente nel liquido viene trasformato in presenza di fenolo (4-7%), ipoclorito di sodio (0.08-0.11%) e sodio nitroprussiate (0.02%) in una soluzione alcalina di blu-indofenolo. L'intensità del colore blu che si forma è legato alla concentrazione di NH_3 . Il pH ottimale per la reazione è di 11.3 - 11.7.

I campioni di liquido ruminale da analizzare sono stati centrifugati in triplo per 10 min. (circa 3000 r/min; 1300 g) e successivamente diluiti 25 volte; successivamente 1 ml di questa diluizione è stata mescolata con 1 ml di acidi tricloro acetico (TCA) e centrifugati per circa 10 min. a 1000 g. Al campione così preparato sono stati aggiunti 10 ml di fenolo, 10 ml di ipoclorito di sodio mescolando nuovamente e posizionando i tubi in un bagnomaria a 37°C per 30 min. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente è stata effettuata la lettura in spettrofotometria a 623 nm di assorbanza contro acqua e i risultati sono stati confrontati con una curva di taratura costruita utilizzando una soluzione standard.

Per la determinazione degli acidi grassi volatili (AGV) un campione di 1.5 ml di liquido ruminale è stato centrifugato (12000 giri per 10 min a 4°C) e diluito 1:1 con una

soluzione di acido ossalico 0.06 M contenente uno standard interno (acetico, propionico, butirrico, isobutirrico, valerianico, isovalerianico).

Gli acidi grassi nel liquido ruminale sono stati analizzati usando un gas cromatografo (GC mega 2 e integrazione chromatography card, Fisons instruments Milano) colonna capillare (Alltech EC-1000, length 30 m, ID 0.53, film 1.00 μm) utilizzando l'elio come gas carrier, (T_1 110°C for 1 min 18°C/min e T_2 a 200°C per 1 min) con F.I.D. in modalità split 1:10, T detector e iniettore 225°C.

Da ciascuna vacca al momento del prelievo del liquido ruminale è stato determinato il pH mediante un pH-metro portatile.

Elaborazione statistica

L'influenza della dieta impiegata [Erba medica, Lupinella+PEG, 50 giorni di Lupinella (per un totale di 16 prelievi), Erba medica Post Lupinella] su tutti i dati ottenuti dai tre animali:

- archeobatteri espressi come numero di copie per ml o come logaritmo in base 10 per ml;
- protozoi totali espressi come numero di cellule per ml o come logaritmo in base 10 per ml;
- AGV totali e singoli acidi: acetico, propionico, butirrico, isobutirrico, valerianico e isovalerianico, nonché il rapporto acetico/propionico (A/P);
- ammoniaca (NH_3);
- pH

è stata valutata statisticamente impiegando l'analisi della varianza a un fattore (PROC GLM del pacchetto statistico SAS, 2000); la differenza tra le medie è stata valutata con il test del t di Student. Al fine di rendere omogenea la distribuzione dei prelievi durante tutta la prova, per i periodi di trattamento Erba medica, Lupinella+PEG e Erba medica Post-Lupinella, l'elaborazione statistica è stata effettuata utilizzando le medie relative a tre prelievi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In tabella 4 vengono riportati i dati relativi agli archea, ai protozoi e ai prodotti di fermentazione (AGV e NH_3) ottenuti durante tutto il periodo di prova (11 settimane).

Fatta eccezione per il pH e gli archea, i diversi trattamenti impiegati hanno avuto un effetto altamente significativo sul numero dei protozoi ($P < 0.0001$) e sulla concentrazione di acidi grassi volatili ($P < 0.0029$) e di ammoniaca ($P < 0.0001$).

Complessivamente il numero di protozoi contati nel materiale ruminale non si discosta di molto da quello riportato da altri autori (10^4 - 10^6 cellule/ml) per la specie bovina, sebbene in condizioni sperimentali differenti (Dehority, 1984; Moss, 1993; Arakaki et al., 2007).

Anche i valori di AGV totali (92.60-138.2 mM/l) e di ammoniaca (35.8-138.2 mg/l) risultano nella norma (Mariani e Podestà, 1996; Hristov et al., 2001; Sconhusen et al. 2003).

I valori di pH sono risultati leggermente superiori al *range* considerato normale (6.2 – 6.5) per un rumine ben funzionante, tuttavia è stato registrato un valore inspiegabilmente basso nel 12° giorno (pH: 6.11).

In tabella 3 è riportato il contenuto in polifenoli della lupinella.

Tabella 3.

Contenuto in composti polifenolici nella lupinella

Flavonoli	<i>Mmol/g s.s.</i>
Catechina	1.55
Epicatechina	3.97
Proantocianidine	9.16
Totali	14.68

Protozoi

In figura 7 sono state riportate tre foto rappresentanti i protozoi ciliati identificati nel materiale ruminale ad ingrandimenti pari a 40 e 100 X, utilizzando un microscopio ottico.

Facendo riferimento al primo periodo sperimentale (tabella 4) non sono emerse differenze statisticamente significative nel numero di protozoi presenti nella dieta a base di erba medica (5.79 log/ml) e in quella a base di lupinella addizionata con il PEG 400 (5.77 log/ml). La differenza nel numero di protozoi risulta essere statisticamente significativa ($P < 0.05$) già dal primo giorno dopo la fine dell'utilizzo del PEG (5.69

log/ml) e continua ad essere statisticamente rilevante ($P < 0.01$) fino al decimo giorno. Successivamente, i dati rimangono significativamente più bassi per tutta la durata del periodo sperimentale ($P < 0.01$) ad eccezione dei valori in corrispondenza del 12° (5.77 log/ml), 15° (5.77 log/ml) e 37° (5,76 log/ml) giorno, quando si verifica un aumento della popolazione protozoaria totale e le differenze non risultano essere più significative, né usando come paragone il periodo di controllo con la dieta a base di erba medica, né con il primo periodo di dieta a base di lupinella e PEG.

In figura 8 viene riportato l'andamento del numero di protozoi in tutto il periodo sperimentale; per meglio evidenziarne le variazioni dell'andamento per i primi due trattamenti sono stati riportati i valori dei tre singoli prelievi. Dopo una evidente diminuzione dei microrganismi a partire dall'inizio dell'impiego della lupinella si evidenzia un'alternanza di valori bassi e alti, che tuttavia si mantengono mediamente (5.69 log/ml) al di sotto della media relativa al periodo di controllo (5.79 log/ml) e al periodo di somministrazione del PEG (5.78 log/ml), nonché al periodo in cui è stata somministrata nuovamente l'erba medica (5.79 log/ml) alla fine della prova.

Come dimostrato in precedenti studi (Monforte-Briceño et al., 2005), i tannini presenti nella lupinella potrebbero essere responsabili dell'inibizione della popolazione dei protozoi ruminanti (Puchala et al., 2005; Tavendale et al., 2005). L'effetto inibitorio risulta essere verosimilmente limitato in questo caso dalla presenza del PEG impiegato durante la prima fase dell'esperimento, che entrerebbe quindi in competizione con i tannini e ne impedirebbe la loro aggregazione con le proteine a vantaggio dello sviluppo protozoario (Makkar et al., 1995).

Archeobatteri

Il numero dei metanogeni non mostra differenze statisticamente significative (tabella 4), probabilmente a causa della grossa variabilità individuale riscontrata nell'analizzare questo parametro, considerato anche il contenuto numero di animali utilizzati. Tuttavia, come raffigurato nella figura 6, è possibile individuare una linea di tendenza che ci permette di commentare tali risultati. Nel momento in cui la dieta controllo (Erba medica) passa a quella base di lupinella e PEG, si nota una netta diminuzione del numero degli archeobatteri, che si intensifica in corrispondenza del 5° giorno di somministrazione della lupinella in assenza di PEG. Inoltre, nella prima settimana in cui viene somministrata la dieta a base di lupinella anche per tutti gli altri parametri

(numero di protozoi, produzione di acidi grassi volatili e ammoniaca) si verifica una riduzione dei valori.

Successivamente (19° giorno circa) i valori aumentano ma si mantengono comunque al di sotto della dieta a base di erba medica. L'inibizione del numero di metanogeni sembra, quindi, essere associata alla diminuzione della popolazione protozoaria, in accordo con i risultati riportati da Goel et al. (2008). In assenza di protozoi, il numero di batteri totali generalmente aumenta (Mathieu et al., 1998), ma tale crescita comporta un declino della proporzione dei metanogeni sul totale dei microrganismi batterici (Takenaka e Itabashi, 1995).

Ammoniaca

I risultati relativi all'ammoniaca, riportati in tabella 4 e nella figura 9, mostrano un netto e significativo ($P<0.01$) calo della sua concentrazione al momento del cambio della dieta dall'erba medica (138.2 mg/l) alla lupinella con PEG (85,37 mg/l). Nel quinto giorno dopo la fine dell'utilizzo del PEG viene raggiunto il valore minimo (35.80 mg/l; $P<0.0001$). Successivamente, si registra un aumento dei valori fino all'inizio della terza settimana di sola lupinella (giorni 15° e 17°), e poi valori, non significativamente differenti ma mediamente più bassi, se confrontati con quelli dell'erba medica, ma più alti rispetto alla lupinella+PEG. Nell'ultimo periodo non è possibile individuare una stabilizzazione dei dati ottenuti.

Diversamente da quanto riscontrato per i protozoi, il PEG non sembra aver un chiaro effetto sulla produzione di ammoniaca, tuttavia la differente composizione proteica delle due diete (erba medica e lupinella) potrebbe aver influenzato questo risultato.

Si notare che il calo della concentrazione di ammoniaca è tendenzialmente correlato ad ogni decremento del numero dei protozoi. Williams e Coleman (1988) riportano che la diminuzione dei livelli di ammoniaca è uno dei più consistenti effetti della defaunazione, per il ruolo che i protozoi hanno nel metabolismo proteico.

Dall'osservazione della figura 10 si nota che, durante tutto il periodo sperimentale, l'andamento dell'ammoniaca segue quello degli acidi grassi volatili; entrambi i parametri diminuiscono passando da lupinella + PEG a lupinella e dal 21° giorno tendono ad aumentare nuovamente. Arakaki et al. (1994) riportano che il numero dei protozoi ha una notevole influenza sulla produzione di AGV nel rumine bovino.

Acidi grassi volatili (AGV)

Come è possibile osservare dalla tabella 4, relativamente agli AGV non sono state riscontrate differenze significative tra la dieta con l'erba medica somministrata per l'adattamento iniziale degli animali (124.51 mM/l) e la dieta lupinella+PEG (122.48 mM/l).

La variazione della quantità degli acidi grassi volatili (Figura 11) durante l'impiego della dieta a base di lupinella, sembra seguire l'andamento dei protozoi ruminali, mostrando un decremento significativo ($P < 0.01$) nella prima settimana di dieta con la lupinella fino al 10° giorno e un aumento nel 12° giorno (134.50 mM/l), cui corrisponde anche un aumento del numero dei protozoi.

Come si evince dalla tabella 5 e dalla figura 11 la tendenza degli AGV, dalla 7ª settimana in poi, si mantiene mediamente al di sotto dei valori lupinella+PEG per tutto il periodo della prova.

Questo risultato è in linea con la maggior parte degli studi sulla defaunazione, in cui l'assenza dei protozoi è associata a una diminuzione degli AGV totali; tuttavia, altri esperimenti riportano una produzione di AGV più elevata (Grummer et al., 1995; Stern e Hinkson, 1974) o non variata (Hinkson et al., 1976; Itabashi et al., 1982) in condizioni di defaunazione.

Fonty et al. (1983) in uno studio sugli agnelli hanno riportato che, l'inoculo costituito da una singola specie di protozoi ha comportato un aumento di AGV e un cambiamento nelle proporzioni tra acetato, propionato e butirrato; tale risultato supporta l'ipotesi che la produzione di tali metaboliti è variabile in funzione della specie di microrganismi presenti.

Come indicato da Whitelaw et al. (1984) e da Williams e Coleman (1988), i cambiamenti nelle concentrazioni di acidi grassi volatili nel rumine sono direttamente attribuiti ai protozoi e ai batteri. In particolare, i protozoi sono responsabili delle variazioni dell'acido acetico e butirrico, e rendono l'idrogeno, derivante dalle fermentazioni, disponibile per l'utilizzo da parte dei batteri ruminali (Schonhunsen et al., 2003). Nel nostro studio gli acidi grassi volatili più rappresentati (acetico, propionico e butirrico) sembrano seguire andamento analogo (Figura 12); questo risultato sembrerebbe in disaccordo con quanto riportato da Hungate (1966) che indica un aumento dell'acido propionico in presenza di una diminuzione dei protozoi e quindi, come riportato anche da altri autori (Arakaki et al., 2007; Goel et al., 2008) una diminuzione del rapporto acetato/propionato. Generalmente, la riduzione dei prodotti di

fermentazione è indice di una ridotta attività fermentativa, legata ad una probabile riduzione dei microrganismi presenti. I tannini comportano, quindi, una riduzione delle fermentazioni analogamente a quanto viene riportato da vari autori (Wang et al., 1997; Francis et al., 2002; Hess et al., 2003) per le saponine.

In questa sperimentazione la produzione di latte di ogni animale si è mantenuta su livelli costante, in disaccordo con quanto riportato da Makkar et al. (2003), i quali hanno osservato una più alta produzione di latte in ruminanti che ricevevano una dieta ricca in tannini, attribuendo tale risultato ad un aumento della quota di azoto non ammoniacale che giunge nell'intestino.

CONCLUSIONI

In questo studio, i tannini presenti nella lupinella sembrerebbero aver ridotto il numero di protozoi, con conseguente diminuzione della degradazione proteica e quindi delle concentrazioni di ammoniaca e acidi grassi volatili. Come atteso, l'effetto inibitorio è stato comunque limitato dalla presenza del PEG. Anche se il risultato non sembra essere così evidente per tutti i parametri analizzati.

L'andamento irregolare dei valori durante tutto il periodo di prova potrebbe far pensare ad una sorta di adattamento della popolazione microbica del rumine alla presenza dei fattori anti-nutrizionali; i protozoi e i batteri, infatti, potrebbero attuare dei meccanismi difensivi per contrastare l'effetto dei tannini.

Probabilmente, per ottenere risultati più chiari occorreva utilizzare una percentuale maggiore di lupinella, ma per questioni tecniche non si è potuta superare la quantità utilizzata.

Ulteriori studi si rendono tuttavia necessari per definire in che termini una dieta a base di una leguminosa ricca in tannini, quale la lupinella, può influenzare il cambiamento della popolazione ruminale e dei parametri fermentativi. Tali informazioni saranno utili per trovare un buon equilibrio tra i parametri dell'ambiente ruminale e le performance animali, anche in relazione ad una riduzione dell'impatto ambientale che riguarda le produzioni di metano di derivazione zootecnica

Tabella 4.*Archea, protozoi e prodotti di fermentazione del rumine nei trattamenti impiegati*

Trattamento	Archea	Protozoi	tAGV	NH₃	pH
	<i>log/ml</i>	<i>log/ml</i>	<i>mM/l</i>	<i>mg/l</i>	
Erba Medica	8.14	5.79	124.51	138.2	6.63
Lupinella+PEG	7.51	5.77	122.48	85.37	6.55
Lupinella 1° g	7.53	5.69	95.12	57.44	6.74
Lup 2° g	7.69	5.66	99.76	63.11	6.74
Lup 3° g	7.39	5.59	95.45	50.97	6.71
Lup 4° g	7.23	5.62	92.60	64.64	6.79
Lup 5° g	6.67	5.67	95.37	35.8	6.69
Lup 8° g	7.65	5.66	98.16	94.17	6.72
Lup 10° g	7.88	5.71	111.56	119.19	6.53
Lup 12° g	7.05	5.77	134.50	114.08	6.11
Lup 15° g	7.78	5.76	101.06	114.87	6.87
Lup 17° g	-	5.69	119.10	107.23	6.6
Lup 19° g	7.69	-	97.44	61.17	6.79
Lup 23° g	7.79	5.68	96.34	109.06	6.73
Lup 30° g	-	5.63	117.81	118.8	6.32
Lup 37° g	-	5.77	112.60	53.02	6.69
Lup 44° g	-	-	112.36	98.74	6.76
Lup 50° g	-	5.70	95.97	57.41	6.63
Erba medica Post-Lup	-	5.79	111.35	104.92	6.66
Varianza dell'errore	0.62	0.00139	159.63	332.32	0.049
Probabilità	0.2532	0.0001	0.0029	0.0001	0.0477

AGV: acidi grassi volatili; NH₃: ammoniaca.

Tabella 5.*Concentrazione degli acidi grassi volatili nei vari trattamenti*

Trattamento	Acetico mM/l	Propionico mM/l	Iso-Butirrico mM/l	Butirrico mM/l	Iso-Valerianico mM/l	Valerianico mM/l
Erba Medica	84.53	21.43	1.03	14.54	1.59	1.39
Lupinella+PEG	81.99	22.39	0.91	14.16	1.53	1.49
Lup 1° g	64.27	17.25	0.66	10.81	1.08	1.05
Lup 2° g	68.14	17.71	0.79	10.86	1.25	1.25
Lup 3° g	64.57	17.47	0.69	10.53	1.18	1.01
Lup 4° g	62.01	17.18	0.73	10.36	1.25	1.08
Lup 5° g	65.98	16.76	0.65	9.94	1.11	0.92
Lup 8° g	65.31	18.74	0.81	10.69	1.47	1.13
Lup 10° g	72.72	21.9	0.88	12.74	1.72	1.6
Lup 12° g	87.19	27.02	0.87	15.88	1.71	1.84
Lup 15° g	67.38	18.1	0.84	12.05	1.43	1.26
Lup 17° g	79.79	21.87	0.94	13.22	1.71	1.57
Lup 19° g	66.51	17.2	0.73	10.72	1.2	1.08
Lup 23° g	65.98	15.88	0.74	11.99	1.08	0.96
Lup 30° g	78.87	21.98	1.03	13.03	1.46	1.44
Lup 37° g	79.43	17.96	0.89	11.86	1.37	1.1
Lup 44° g	77.85	19.4	0.95	11.32	1.63	1.21
Lup 50° g	66.47	16.11	0.81	10.33	1.27	0.99
Erba medica Post-Lup	74.29	20.63	0.75	12.86	1.41	1.41
Varianza dell'errore	70.37	16.68	0.01	1.84	0.11	0.08
Probabilità	0.0056	0.1571	0.0011	0.0001	0.2197	0.0001

Figura 5.

Curve relative ad una delle piastre usate per la determinazione degli Archea
Amplification Chart

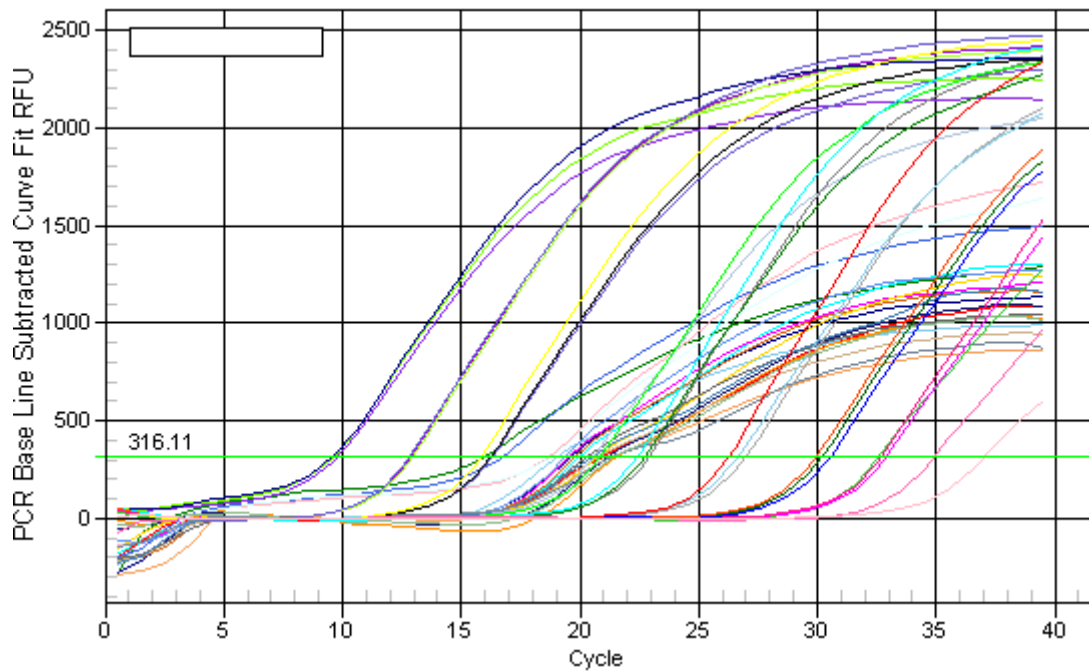


Figura 6.

Andamento del numero degli Archea nel rumine durante il periodo sperimentale

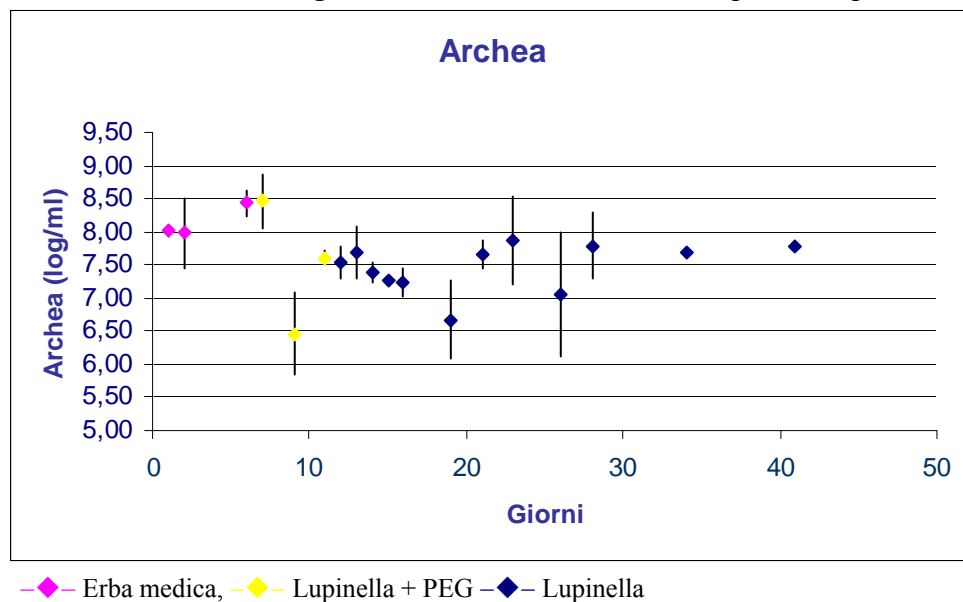


Figura 7.
Protozoi ruminanti osservati al microscopio ottico (40 e 100 X)

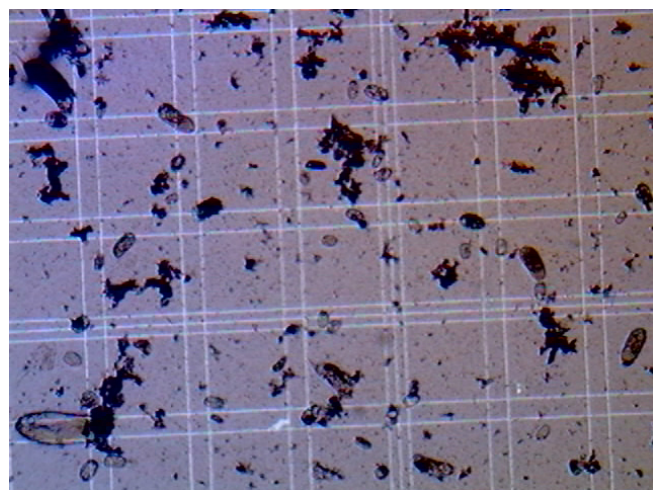
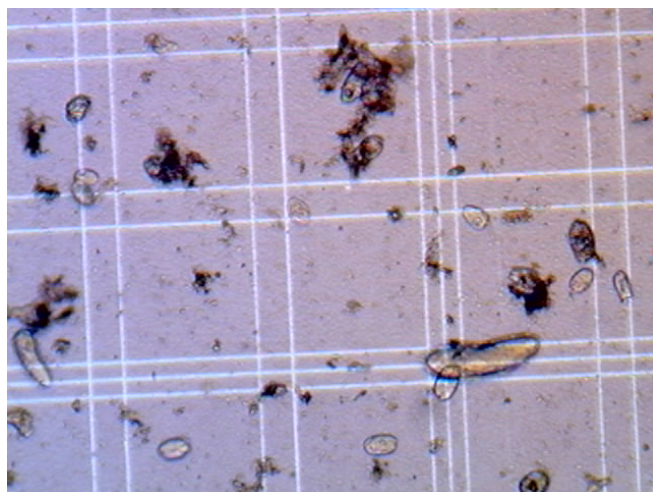
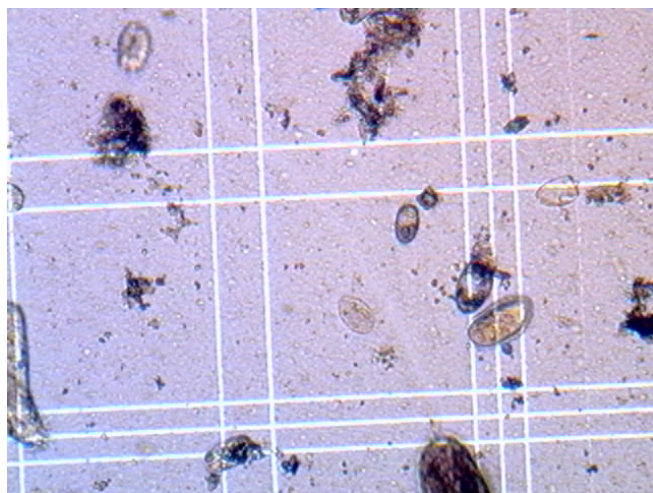


Figura 8.
Andamento del numero di protozoi del rumine durante il periodo sperimentale

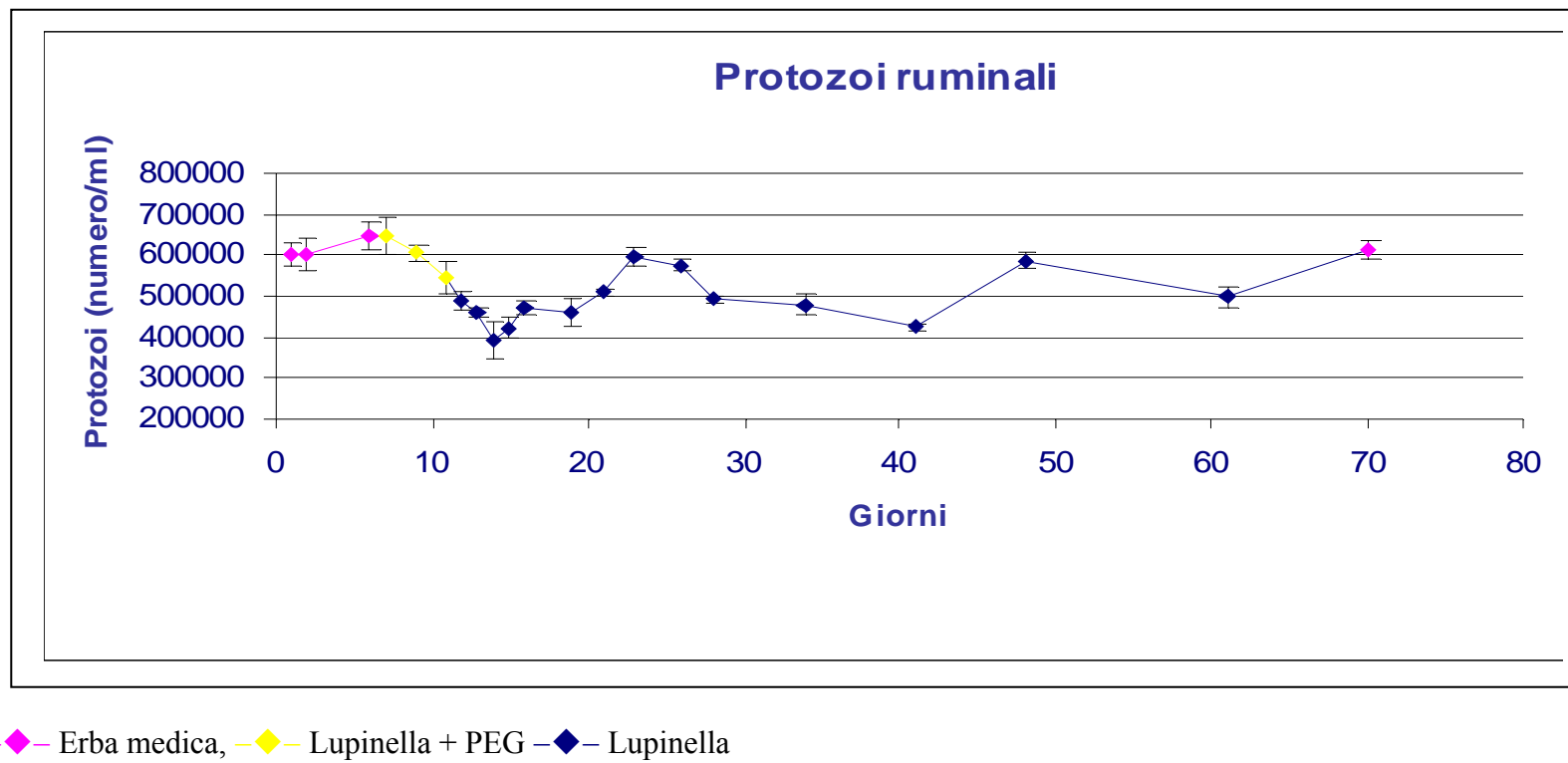


Figura 9.

Andamento dell'ammoniaca nel liquido ruminale

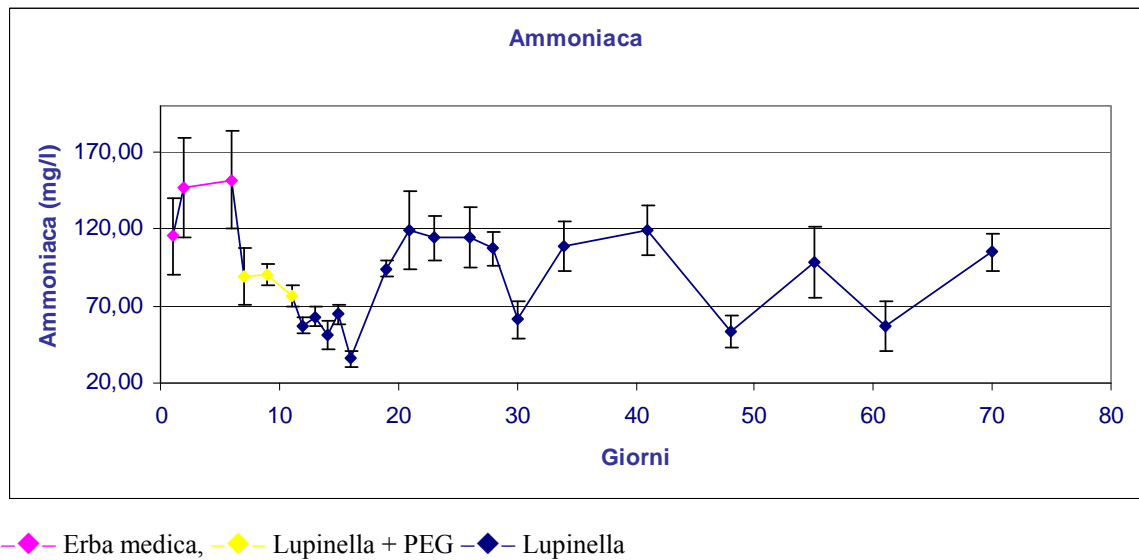


Figura 10.

Confronto tra gli acidi grassi volatili totali e l'ammoniaca durante tutto il periodo sperimentale

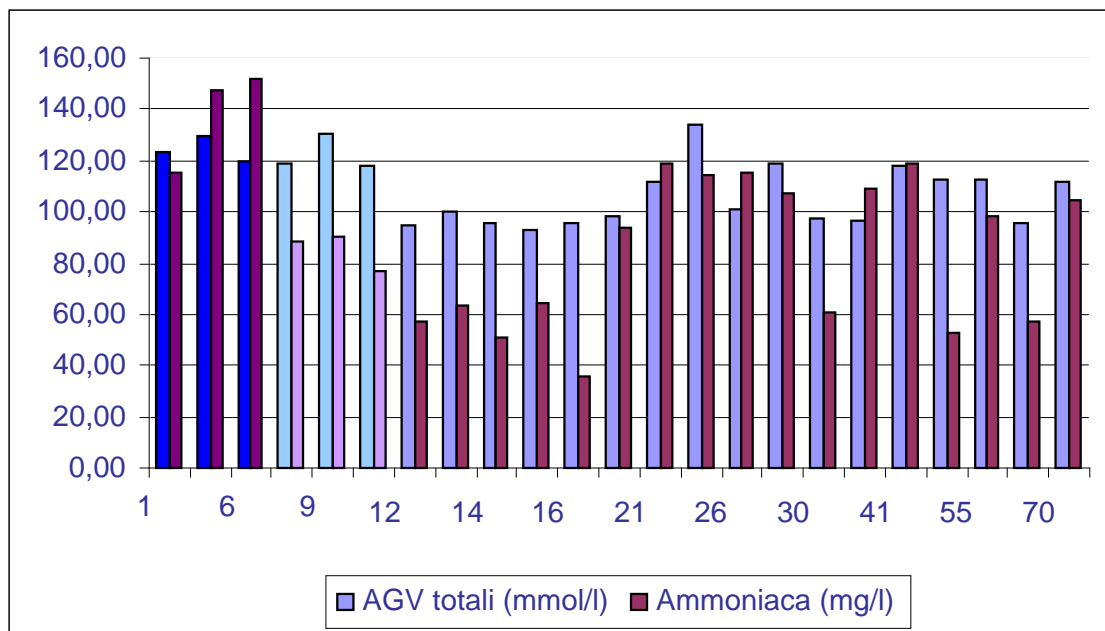


Figura 11.
Andamento della concentrazione totale di acidi grassi volatili nel liquido ruminale

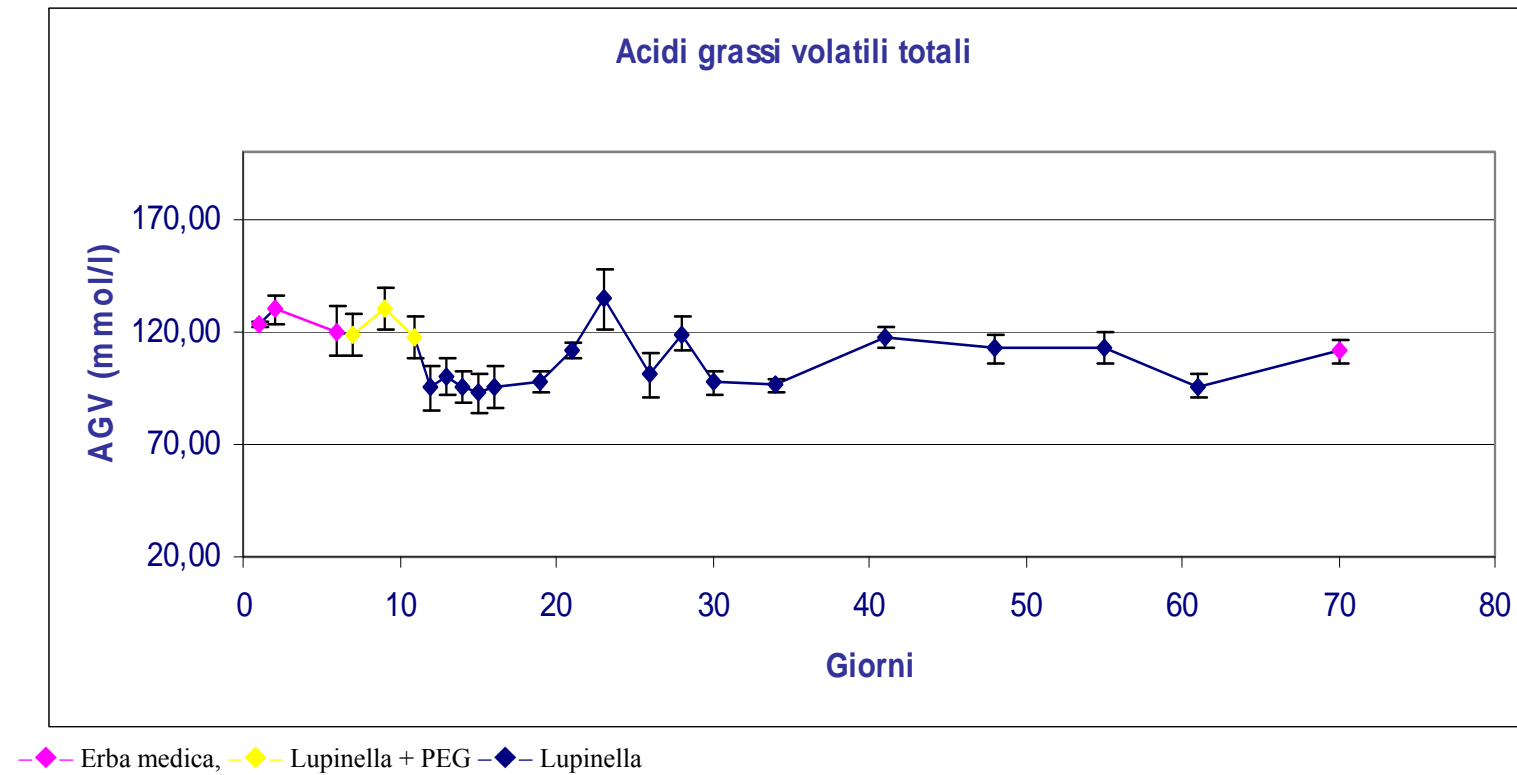
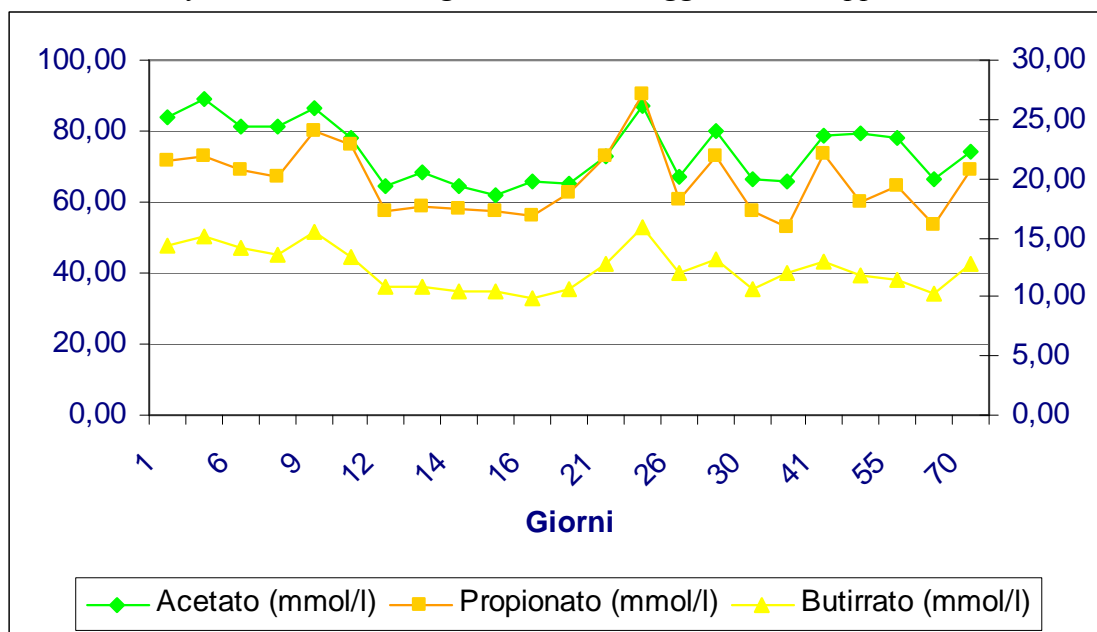


Figura 12.

Confronto dei tre acidi grassi volatili maggiormente rappresentati



CAPITOLO 6.

Effetto del PEG sulle caratteristiche *in vitro* del fieno di lupinella

INTRODUZIONE

I tannini che creano forti legami con le proteine, sia alimentari che endogene, possono essere inattivati da una agente competitivo come il polietilenglicole (PEG). Questo polimero sintetico non nutritivo viene escreto nelle feci come complesso tannino-PEG. È noto come il PEG si lega ai tannini, in modo irreversibile, entro un ampio *range* di pH (3.5 – 7.0) evitando così che questi creino complessi con le proteine (Jones e Mangan, 1977); inoltre, è stato osservato che il PEG sia anche in grado di scindere i legami tannino-proteina già formati, grazie alla sua affinità con i tannini che risulta più elevata che con le proteine (Makkar et al., 1995).

Sono stati condotti diversi esperimenti *in vivo* (Silanikove et al., 1997; Ben Salem et al., 2000; Decandia et al., 2000; Frutos et al., 2002, Infascelli et al., 2005) su piccoli ruminanti alimentati con alimenti ricchi in tannini, con o senza l'aggiunta di PEG; i risultati hanno confermato che la riduzione della quota di proteina degradabile, conseguente alla presenza di tannini nella dieta, influisce positivamente sulle prestazioni produttive.

Per la valutazione dell'attività dei tannini *in vitro* con la tecnica della produzione di gas, il PEG viene comunemente impiegato come agente per la loro neutralizzazione (Sandoval Castro et al., 2003).

OBIETTIVO DELLA PROVA

Questo breve contributo sperimentale rientra nel più ampio progetto di ricerca finalizzato a valutare i fattori che influenzano la produzione di metano a livello ruminale. In particolare, vengono di seguito riportati i risultati ottenuti da una prova di

IVGPT condotta per valutare l'effetto della presenza o meno di PEG sulle caratteristiche di fermentazione *in vitro* di un fieno di Lupinella con quantitativi diversi di tannini.

MATERIALE E METODI

Una prova di fermentazione *in vitro* è stata realizzata impiegando la tecnica della produzione cumulativa di gas e incubando con liquido ruminale bufalino per 96 ore quattro campioni di fieno di Lupinella raccolti a quattro stadi fenologici diversi e un fieno di Erba medica, impiegato per confrontare le caratteristiche di fermentazione di una leguminosa con basso contenuto in tannini.

Inoltre, allo scopo di inibire l'azione degli eventuali tannini presenti nella lupinella, contestualmente sono stati incubati tutti i substrati insieme ad una soluzione di PEG 400 (poli-etilenglicole).

Alimenti testati e analisi effettuate

Quattro campioni di lupinella (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) seminata nell'autunno 2007 presso un'azienda agro-zootecnica sita in Sant'Angelo dei Lombardi (AV), sono stati raccolti a giugno 2008 a diversi stadi fenologici:

5. inizio fioritura con fusti in accrescimento (LUP_1)
6. comparsa dell'infiorescenza (LUP_2)
7. comparsa infiorescenza senza fiori aperti (LUP_3)
8. fine fioritura con comparsa dei semi (LUP_4)

e conservati mediante fienagione.

Il fieno di erba medica (*Medicago sativa*) scelto per il confronto (EM) proveniva da un'azienda in provincia di Caserta, era stato raccolto allo stadio di fioritura e si presentava ricco di fogli e poco lignificato.

I foraggi sono stati trasportati presso il laboratorio "Analisi degli alimenti" del Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti dove sono stati macinati con griglia 1 mm mediante mulino Brabender (Wiley mill, Brabender OHG, Duisburg, Germany). Successivamente, sono stati analizzati per la composizione chimica seguendo lo schema Weende, in accordo con il metodo proposto dalla Commissione Valutazione Alimenti dell'ASPA (1980); il frazionamento dei carboidrati di struttura è stato effettuato secondo quanto riportato da Van Soest et al. (1991).

Caratteristiche di fermentazione *in vitro*

Le caratteristiche di fermentazione dei foraggi sono state studiate mediante la IVGPT (Calabrò, 1999) che ha previsto l'incubazione dei substrati essiccati e macinati con

inoculo ruminale tamponato in condizioni di anaerobiosi a 39°C, per 96 ore; la produzione di gas durante il processo fermentativo è stata misurata 18 volte (a 4, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 31, 35, 42, 48, 54, 57, 69, 72 e 96 ore) mediante un sistema manuale costituito da un trasduttore di pressione.

Ciascun foraggio è stato pesato ($1.0063 \text{ g} \pm 0.0019$), in tre replicazioni, in bottiglie da siero da 120 ml; contestualmente sono state incubate altrettante bottiglie (15) aggiungendo in ciascuna 1 ml di soluzione PEG 400 all'8%, preparata considerando una percentuale media di tannini nella Lupinella pari all'8%, secondo quanto riportato da Barry e Forss (1982).

Per una descrizione più dettagliata circa la preparazione del medium utilizzato (Theodorou et al., 1994) e del trasduttore di pressione impiegato per le letture del gas si rimanda al capitolo 2 di questa tesi.

Il liquido ruminale è stato prelevato al momento della macellazione da 3 bufali (*Bubalus bubalis*) alimentati con una dieta standard (PG: 12 % s.s.; NDF: 45.5 % s.s.). Il liquido prelevato è stato posto rapidamente in thermos preriscaldati e trasportato in borse termiche presso i laboratori del Dipartimento.

Al termine delle 96 ore di incubazione, le bottiglie sono state aperte e, tramite una sonda, è stato determinato il pH (pH-metro: Alessandrini Instruments, elettrodo di vetro mod. Jenway-3030) per verificare l'efficienza del sistema tampone ed individuare eventuali fermentazioni anomale.

Per ogni bottiglia a ciascun tempo di incubazione, i volumi cumulativi di gas sono stati rapportati alla sostanza organica incubata ed elaborati con un modello sigmoidale (Groot et al., 1996):

$$G = A / (1 + (C / t)^B)$$

dove G rappresenta la quantità di gas (ml/g) prodotta al tempo t; A la produzione di gas (ml/g); B il tempo necessario a produrre una quantità di gas pari ad A/2; C una costante che definisce la forma della curva. Inoltre, utilizzando gli stessi parametri del modello, sono stati calcolati il tempo a cui si raggiunge la velocità massima (T_{\max} , h), nonché la velocità massima di fermentazione (R_{\max} , ml/h), come riportato da (Bauer et al., 2001):

$$R_{\max} = [A * C^B * B * (T_{\max}^{-(B-1)})] / [1 + C^B * (T_{\max}^{-B})]^2$$

$$T_{\max} = C * \{[(B - 1) / (B + 1)]^{1/B}\}.$$

Elaborazione dei dati

Tutti i parametri stimati dal modello (A , B , T_{\max} , R_{\max}), il volume cumulativo di gas rapportato alla sostanza organica incubata (VCSO, ml/g) e il pH sono stati elaborati con l'analisi della varianza (PROC GLM) del pacchetto statistico SAS (2000) al fine di testare statisticamente le l'influenza dei substrati e del PEG sulle caratteristiche di fermentazione:

$$y_{ijk} = \mu + \text{Sub}_i + \text{Tratt}_j + (\text{Sub} * \text{Tratt})_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove y è la media del parametro considerato, Sub l'effetto substrato ($i = \text{LUP_1}$, LUP_2 , LUP_3 , LUP_4 e EM), Tratt l'effetto trattamento ($j =$ con PEG e senza PEG), Sub*Tratt l'interazione di primo ordine e ε l'effetto dovuto all'errore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La composizione chimica dei fieni analizzati viene riportata in tabella 1. Come riportato anche in bibliografia (Parker e Moss, 1981), mediamente il fieno di lupinella, rispetto al fieno di erba medica raccolto allo stesso stadio fenologico, presenta un minor contenuto in proteine grezze (18.1 vs. 22.6 % s.s., media LUP e EM, rispettivamente) e carboidrati strutturali (NDF: 44.5 vs. 52.3 % s.s., media LUP e EM, rispettivamente). Il contenuto in ceneri, invece, appare molto elevato nell'erba medica (10.9 % s.s.). Altre considerazioni sulla composizione chimica della lupinella sono riferite nel capitolo 2.

In tabella 2 vengono riportate le caratteristiche di fermentazione ottenute *in vitro* a 96 h incubando i cinque foraggi con e senza l'aggiunta di PEG. Tutti i dati presentati sono confrontabili con altri ottenuti in precedenti prove con fieni di leguminose (vedi capitolo2). I valori di pH, tuttavia, risultano alquanto bassi, in particolare per EM, dove scendono al di sotto di 6.2, valore minimo indicato per una buona attività dei cellulolitici.

Come c'era da attendersi quasi tutte le caratteristiche di fermentazione riportate risultano influenzate in modo statisticamente significativo dal substrato e dall'aggiunta di PEG. In particolare, il campione di lupinella raccolto allo stadio di inizio fioritura (LUP_1) mostra una produzione di gas statisticamente ($P < 0.01$) maggiore rispetto agli altri tre tagli e significativamente inferiore ($P < 0.01$) rispetto al fieno di erba medica, probabilmente a causa del suo maggior contenuto in carboidrati facilmente

fermentescibili (NSC: 29.7 % s.s.). Invece, il campione raccolto al momento dell'infiorescenza (LUP_2) mostra una velocità di fermentazione significativamente ($P < 0.01$) più bassa, probabilmente a causa del suo maggior contenuto in lignina (ADL: 16.6 % s.s.) ed in tannini condensati (CT: 31 eq mg/g; vedi capitolo 4).

Rispetto a tutti i campioni di lupinella, l'erba medica, ha mostrato una produzione di gas (reale e potenziale) statisticamente ($P < 0.01$) più elevata (VCSO: 268 ml/g; A: 361 ml/g), probabilmente anche a causa dell'assenza di tannini condensati.

Nel contributo numero 4 i primi tre tagli avevano presentato produzioni di gas significativamente più elevate del quarto taglio ($P < 0.01$). Per quanto riguarda la cinetica di fermentazione, invece, i risultati ottenuti sono sovrapponibili a quelli del contributo precedente in cui sono stati utilizzati gli stessi substrati. Il secondo taglio ha mostrato, in tutti e due i casi, quindi, la cinetica significativamente più lenta rispetto agli altri tre tagli.

C'è da evidenziare che per motivi tecnici in quest'ultimo contributo non è stato possibile utilizzare liquido ruminale bovino come le prove precedenti, ma il liquido utilizzato è stato quello bufalino

Le differenze riscontrate nella produzione di gas, riportate anche in precedenti studi (Calabrò et al. 2004), possono perciò essere attribuite alla specie diversa e alla differente capacità di utilizzare i substrati. Esperimenti *in vitro* sul bufalo (Kamra et al., 2008) hanno dimostrato anche in questa specie consistenti riduzioni della metanogenesi utilizzando estratti vegetali, come tannini e saponine.

Effetto del PEG

Dalla figura 1 alla figura 5 viene riportato l'effetto dell'aggiunta di PEG su i parametri di fermentazione. Le differenze statisticamente significative che emergono indicano che durante la fermentazione *in vitro* l'aggiunta del PEG ha influenzato sia la produzione finale di gas che la cinetica del processo fermentativo nei campioni contenenti tannini. In particolare, il gas prodotto (sia potenziale che reale) è risultato quasi sempre maggiore dopo l'aggiunta di PEG nei campioni di lupinella (in particolare in LUP_2), ma questo non si è verificato nel campione di erba medica. Risultati analoghi sono stati riscontrati da Odenyo et al. (2003) in una prova in cui sono stati incubati *in vitro* diversi foraggi ricchi in tannini o da Makkar et al. (1995b) con l'incubazione di substrati a cui sono stati aggiunte diverse percentuali di tannini .

Inoltre, per tutti i foraggi l'aggiunta del PEG ha ridotto il tempo di dimezzamento (B) ed il tempo di massima velocità di fermentazione (T_{max}).

Per meglio discutere le cinetiche di fermentazione ottenute nei quattro campioni di lupinella e nell'erba medica incubati *in vitro* con e senza PEG, nelle figure 6-12, vengono riportati, per ciascun foraggio, gli andamenti della produzione di gas e della velocità di fermentazione. Per tutti i foraggi l'aggiunta del PEG ha causato una maggiore produzione di gas, soprattutto nelle prime ore di fermentazione, tale effetto è diminuito mediamente dopo le prime 24 ore di incubazione.

In particolare, l'effetto del PEG, che bloccando i tannini favorisce l'attività dei metanogeni, appare molto più evidente nei primi due campioni di lupinella LUP_1 e LUP_2 (figure 6 e 7, rispettivamente), dove il contenuto in tannini condensati è maggiore. Per quanto riguarda l'erba medica, priva di tannini condensati, i profili relativi al gas e alla velocità di fermentazione (figura 10) sono praticamente sovrapponibili con e senza l'aggiunta del PEG.

CONCLUSIONI

Come riportato da altri autori in questo studio emerge l'effetto del PEG sulla produzione di gas e sulla cinetica di fermentazione. L'erba medica, incubata allo scopo avere un confronto con una leguminosa priva di tannini, ha mostrato nette differenze con la lupinella nelle caratteristiche di fermentazione.

La IVGPT si conferma una metodica semplice, valida ed economica anche per studiare l'attività dei tannini contenuti nei foraggi di leguminose.

Tabella 1.*Composizione chimica (% s.s.) dei fieni testati*

	LUP_1	LUP_2	LUP_3	LUP_4	EM
Sostanza secca	88.4	88.6	88.3	89.6	85.2
Proteine grezze	17.5	21.9	20.7	12.2	22.6
Lipidi grezzi	2.23	2.57	2.19	1.90	1.34
NDF	44.1	39.1	43.3	51.4	52.3
ADF	29.6	25.6	34.6	40.9	45.7
ADL	11.91	16.6	13.6	11.3	14.0
Emicellulose	14.5	13.5	8.7	10.5	6.8
NSC	29.7	28.8	27.2	28.8	12.86
Ceneri	6.48	7.66	6.65	5.74	10.9

PG: proteine grezze; FG: fibra grezza; NDF: fibra neutro detersa; ADF: fibra acido detersa; ADL: lignina acido detersa; NSC (carboidrati non strutturali): $100 - (PG + \text{ceneri} + EE + NDF)$.

LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi; EM: fieno di erba medica.

Tabella 2.*Caratteristiche di fermentazione in vitro a 96 h dei fieni testati*

	VCSO	A	B	R_{max}	T_{max}	pH
	<i>ml/g</i>	<i>ml/g</i>	<i>h</i>	<i>ml/h</i>	<i>h</i>	
	Senza l'aggiunta di PEG					
LUP_1	232 ^B	304 ^B	17.5 ^B	10.9 ^A	4.03 ^B	6.35 ^A
LUP_2	210 ^{Cb}	290 ^{Ba}	21.1 ^A	8.67 ^B	4.97 ^{Ab}	6.37 ^A
LUP_3	212 ^{Cb}	279 ^{Bb}	17.4 ^B	10.0 ^A	6.43 ^{Ac}	6.39 ^A
LUP_4	222 ^{Ca}	287 ^{BC}	16.7 ^B	10.6 ^A	4.81 ^B	6.36 ^A
EM	268 ^A	361 ^A	21.7 ^A	10.4 ^A	5.62 ^{Aa}	6.06 ^B
	Con l'aggiunta di PEG					
LUP_1	245 ^C	309 ^A	15.0 ^B	12.7 ^A	4.21	6.42 ^{Aa}
LUP_2	252 ^B	317 ^A	15.8 ^{Ba}	12.4 ^A	4.32	6.32 ^{Ab}
LUP_3	218 ^D	282 ^{BC}	15.9 ^{Ba}	11.1 ^B	3.91	6.35 ^A
LUP_4	217 ^D	273 ^{BC}	14.3 ^{Bb}	11.6 ^{Ba}	4.68	6.34 ^A
EM	270 ^A	362 ^C	20.9 ^A	10.9 ^{Bb}	4.90	6.07 ^B
Substrato	**	**	**	**	NS	**
Trattamento	**	NS	**	**	*	NS
Sub*Tratt	**	**	**	**	NS	NS
Var. Errore	34.14	34.45	0.564	0.196	0.683	0.0025

VCSO: gas cumulativo rapportato alla SO incubata; A: produzione potenziale di gas; B: tempo necessario per la produzione di A/2; t_{max}: tempo a cui si raggiunge la velocità massima; R_{max}: velocità massima di fermentazione.

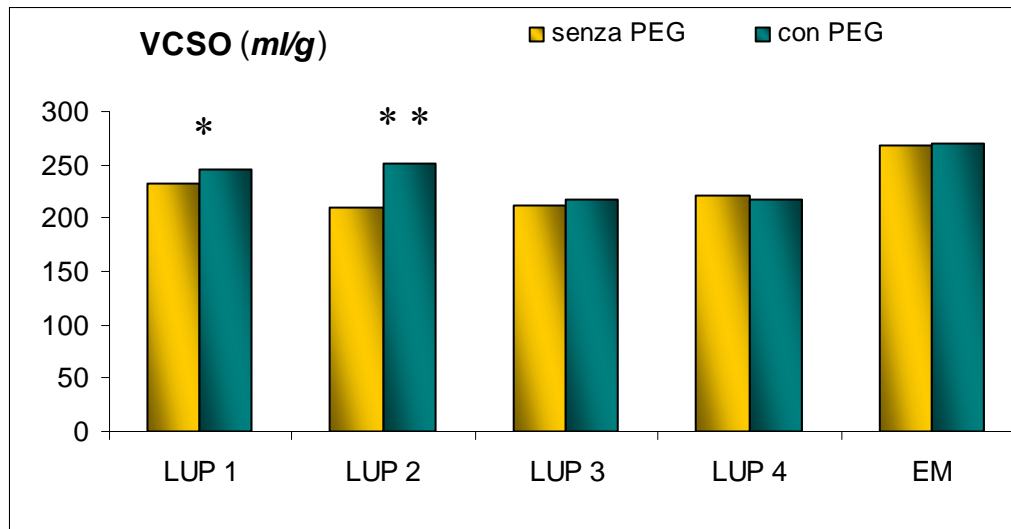
LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi; EM: fieno di erba medica.

**, *, NS: differenze significative per P<0.01, P<0.05 e non significative, rispettivamente.

Lettere diverse lungo la colonna indicano differenze statisticamente significative: a, b, c: P<0.05; A, B, C, D: P<0.01.

Figura 1.

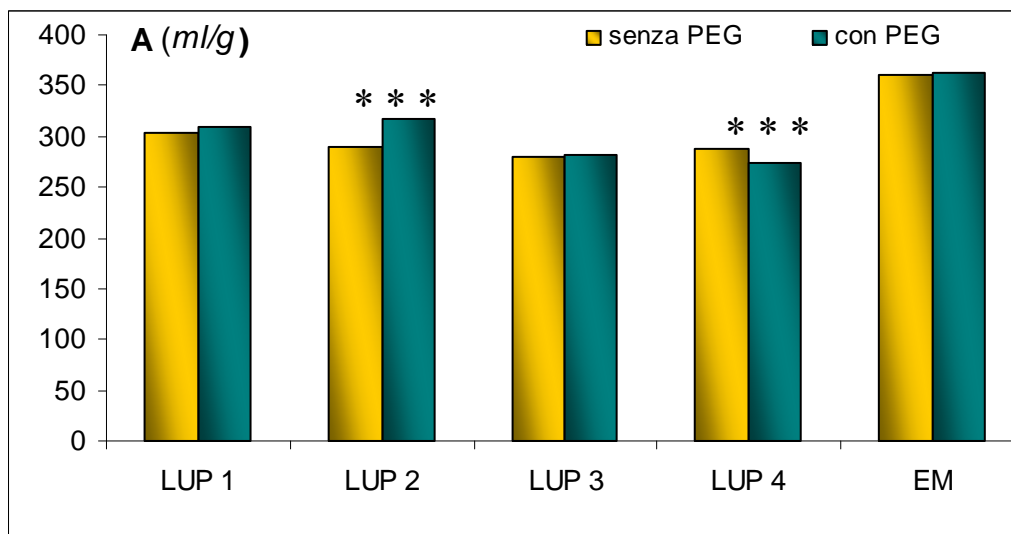
Effetto del PEG sulla produzione cumulativa di gas nei foraggi incubati



*, **: differenze significative per $P < 0.05$ e $P < 0.01$, rispettivamente.

Figura 2.

Effetto del PEG sulla produzione potenziale di gas nei foraggi incubati

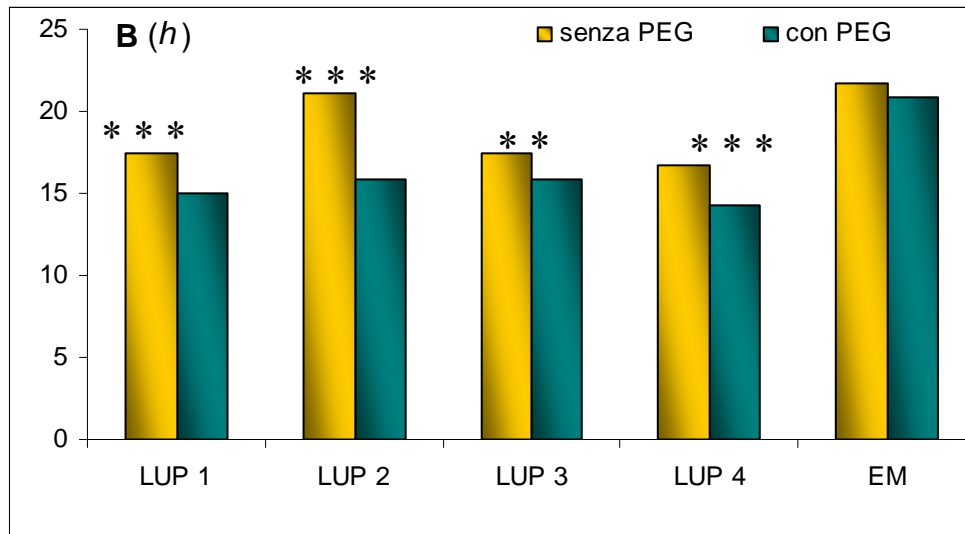


***: differenze significative per $P < 0.001$.

LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi; EM: fieno di erba medica.

Figura 3.

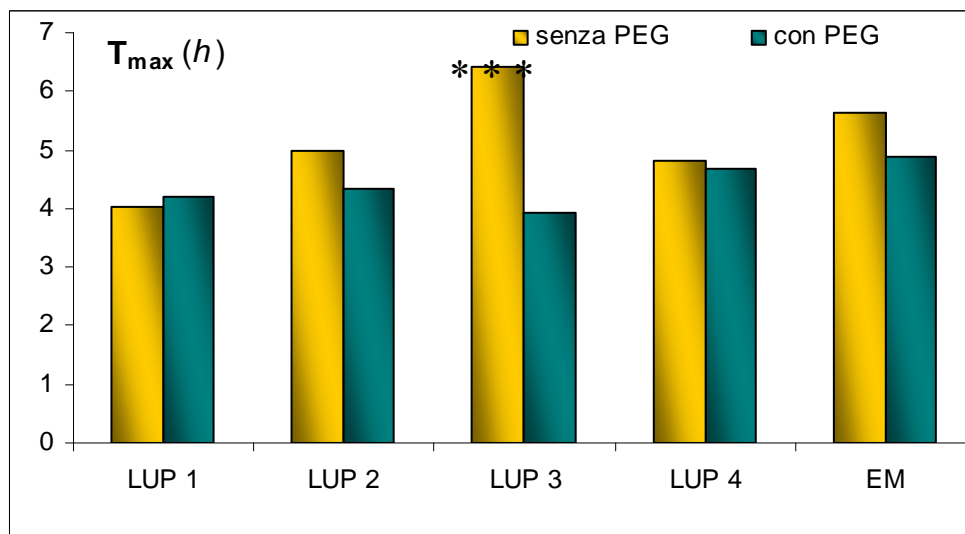
Effetto del PEG sul tempo di dimezzamento nei foraggi incubati



, *: differenze significative per $P < 0.01$ e $P < 0.001$.

Figura 4.

Effetto del PEG sul tempo di velocità massima nei foraggi incubati

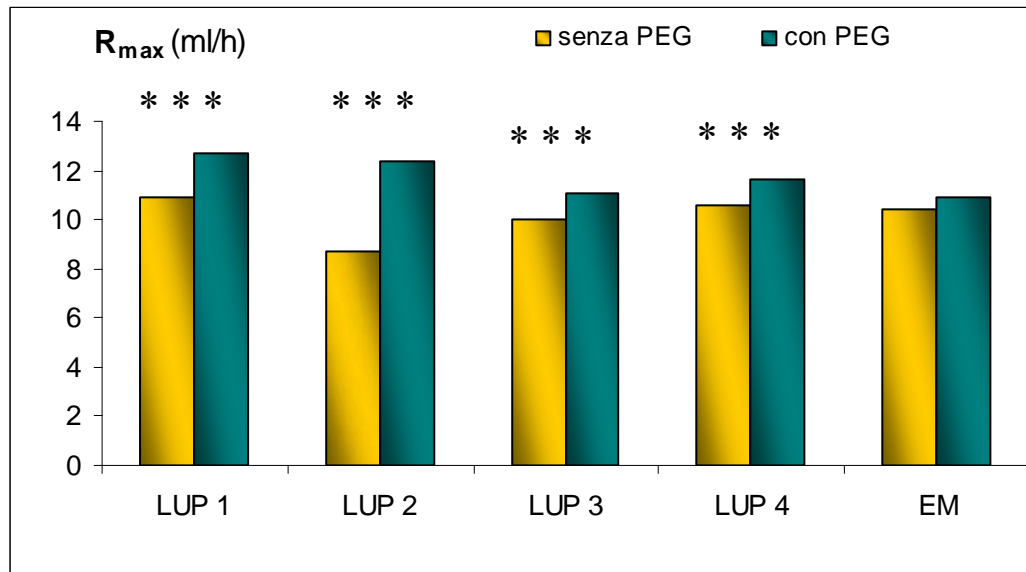


***: differenze significative per $P < 0.001$.

LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento; LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi; EM: fieno di erba medica.

Figura 5.

Effetto del PEG sulla velocità di fermentazione nei foraggi incubati



***: differenze significative per $P < 0.001$.

LUP_1: stadio di inizio fioritura con fusti in accrescimento, LUP_2: momento della comparsa dell'infiorescenza; LUP_3: infiorescenza senza fiori aperti; LUP_4: fine della fioritura con comparsa dei semi; EM: fieno di erba medica.

Figura 6.

Andamento della produzione cumulativa di gas e della velocità di fermentazione di LUP_1

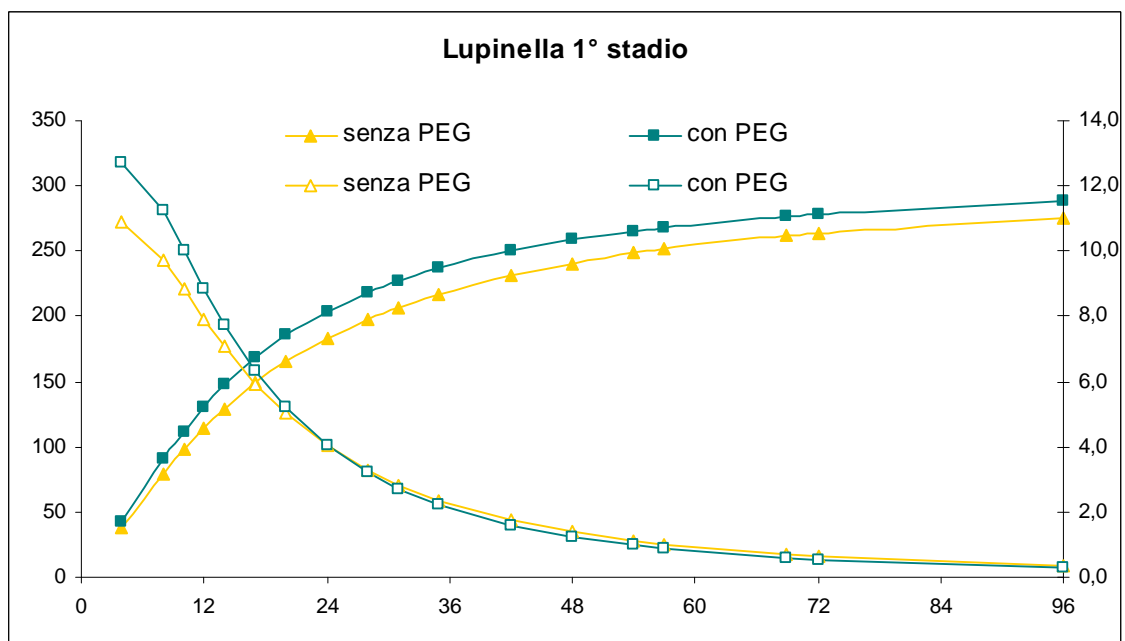


Figura 7.

Andamento della produzione cumulativa di gas e della velocità di fermentazione di LUP_2

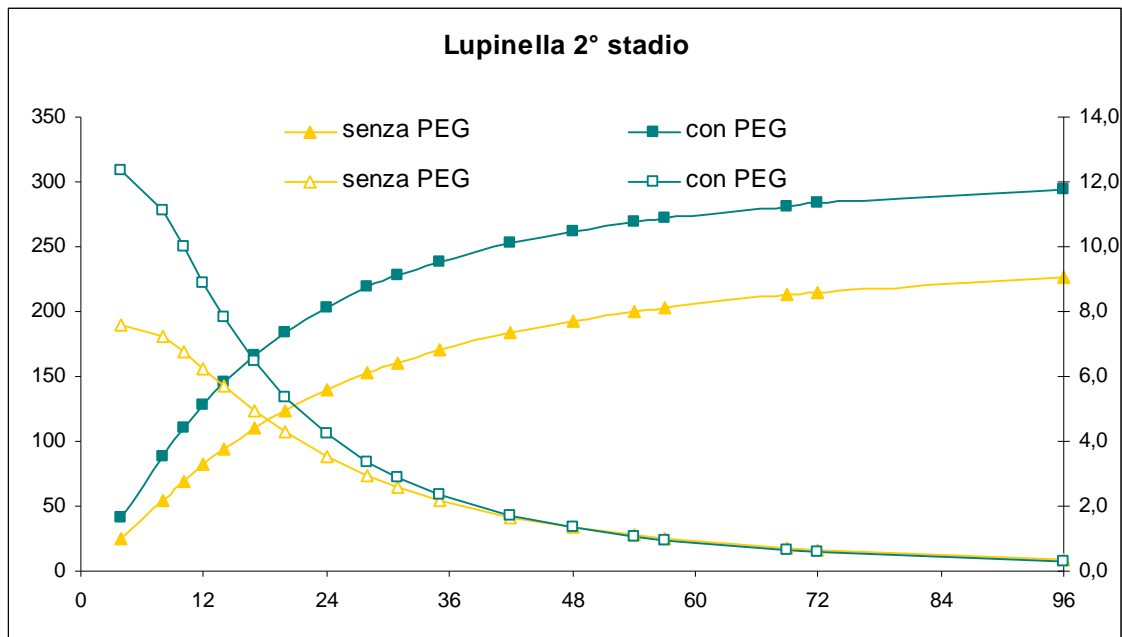


Figura 8.

Andamento della produzione cumulativa di gas e della velocità di fermentazione di LUP_3

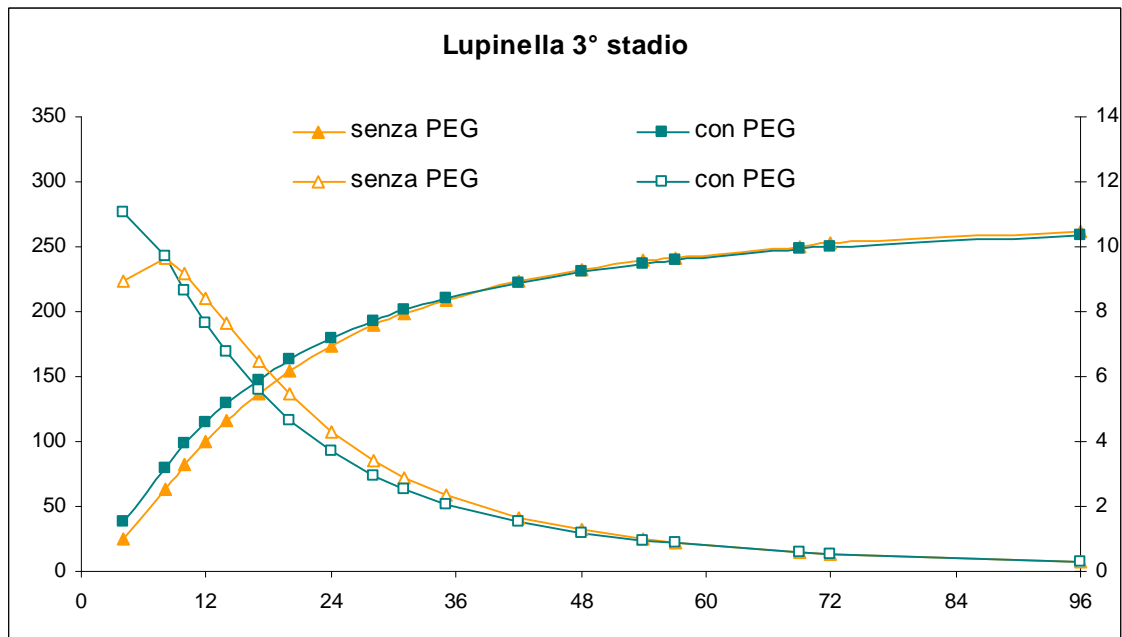


Figura 9.

Andamento della produzione cumulativa di gas e della velocità d fermentazione LUP_4

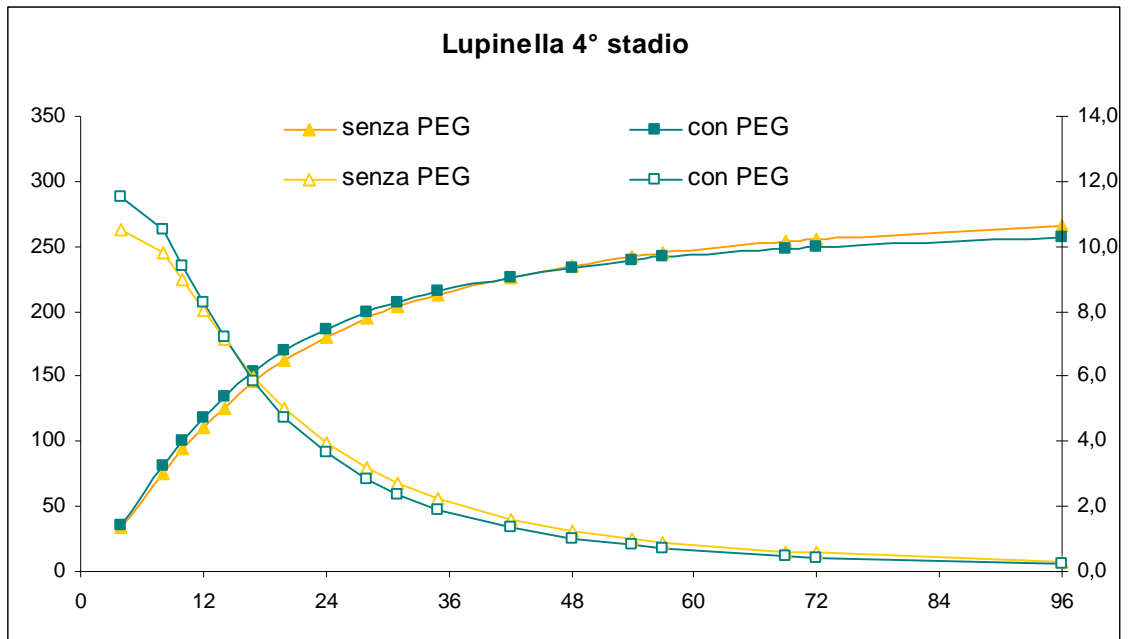
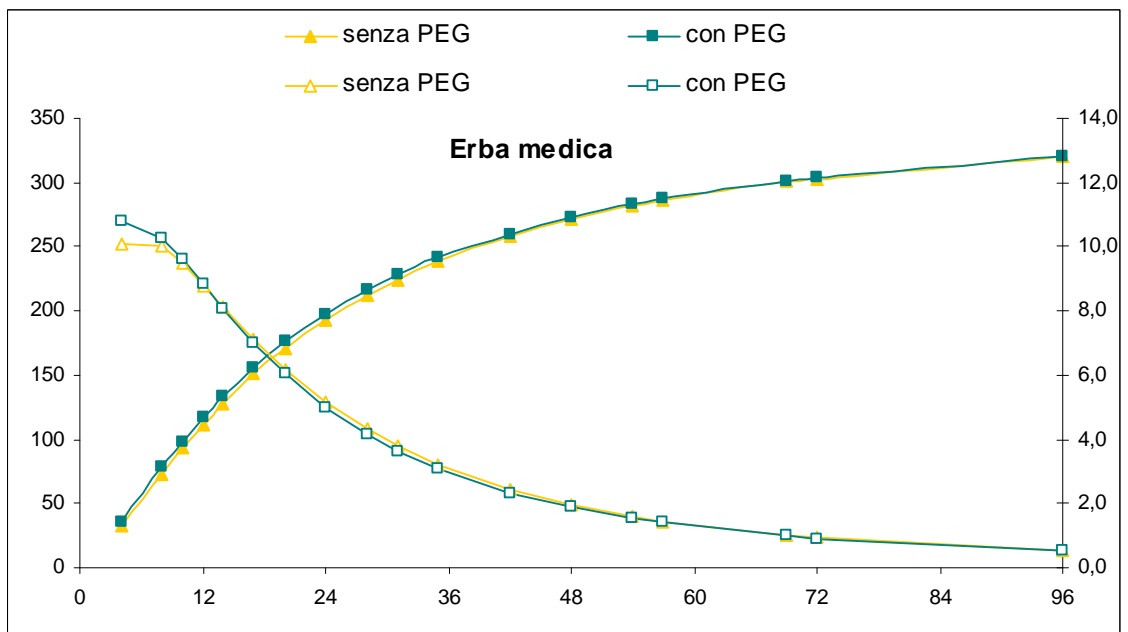


Figura 10.

Andamento della produzione cumulativa di gas e della velocità dell'erba medica



CAPITOLO 7.

Conclusioni generali

La conoscenza della produzione di metano dovuta alle fermentazioni ruminali rappresenta un fattore molto importante per migliorare non solo l'efficienza di utilizzazione dell'energia a livello ruminale, ma anche garantire delle produzioni zootecniche eco-sostenibili.

Le tecniche *in vivo* utilizzate per tali studi risultano onerose dal punto di vista economico e complesse per quanto concerne l'aspetto procedurale; in alternativa, le tecniche *in vitro* sono più semplici per quanto concerne la loro realizzazione e hanno il grosso vantaggio di eliminare o limitare l'utilizzazione degli animali. Molte stime relative alla capacità metanogenica dei nutrienti sono basate su calcoli stechiometrici e non esistono riscontri *in vivo*.

La misurazione del metano, a seguito di fermentazioni ruminali riprodotte *in vitro* con la tecnica della produzione cumulativa di gas (IVGPT), considerata in questa tesi, si è dimostrata alquanto semplice, con una variabilità relativamente bassa tra le replicazioni dello stesso alimento e molto efficiente in quanto permette di testare in maniera precisa anche molti alimenti in tempi relativamente brevi. In particolare, il metano è stato determinato mediante gas-cromatografia e con un metodo chimico al termine dell'incubazione *in vitro* dei substrati con liquido ruminale.

Nella presente tesi è stato valutato come il metano, prodotto nel rumine per opera delle fermentazioni batteriche, può essere influenzato da vari fattori della dieta, (es. tipo di carboidrati, fonte di proteine, presenza di fattori anti-nutrizionali).

Fonti di carboidrati a diversa fermentescibilità ruminale contenuti in diverse materie prime (granella di mais e di orzo, fieno di erba medica, paglia di frumento, silomais, pisello proteico, polpe di barbabietola), che vengono utilizzati nella formulazione di diete per ruminanti hanno influenzato la produzione di metano in modo consistente e congruente (capitolo 2): la maggiore degradabilità della sostanza organica (e molto verosimilmente dei carboidrati) determina una minore emissione di metano.

In un contributo (capitolo 3) è stata valutata la produzione di metano in diete a diverso contenuto di proteine grezze formulate da due fonti proteiche diverse (soia f.e. e favino).

Alla luce dei risultati la maggiore produzione di gas metano e AGV nella dieta con granella vs la farina di estrazione deve far riflettere sulla complessità nella valutazione dell'impatto ambientale di materie e soprattutto di diete, utilizzate nell'alimentazione del ruminante, dando il giusto peso ai vari parametri implicati nell'aspetto produttivo.

Tre contributi della tesi (capitoli 4, 5, e 6) hanno avuto come oggetto il fieno di lupinella (*Onobrychis viciifolia* Scop.), una leguminosa ricca in tannini che di recente ha stimolato l'interesse di molti ricercatori a livello internazionale per il suo elevato tenore in tannini, che interferiscono sull'attività dei metanogeni ruminali. Due studi sono stati effettuati *in vitro* utilizzando quattro campioni raccolti a stadi fenologici diversi: nel primo è stata misurata la produzione di metano mediante gas-cromatografia, nel secondo è stata verificata l'attività dei tannini impiegando il PEG e un fieno di erba medica come confronto. Dai risultati ottenuti si può concludere che l'avanzamento dello stadio vegetativo e la presenza di tannini condensati hanno un effetto significativo sulla fermentazione dei carboidrati e sull'emissione di metano. Inoltre, come riportato da altri autori emerge l'effetto del PEG sulla produzione di gas totale e sulla cinetica di fermentazione; l'erba medica, incubata allo scopo di avere un confronto con una leguminosa priva di tannini, ha mostrato nette differenze con la lupinella nelle caratteristiche di fermentazione.

Nello studio *in vivo*, realizzato a Wageningen (Paesi Bassi) in collaborazione con il Gruppo di Animal Nutrition, su tre bovine alimentate con diete a base di Lupinella sono stati valutati i cambiamenti che avvengono nel rumine a seguito della presenza dei tannini mediante quantificazione dei metanogeni e conta dei protozoi. In questo studio, i tannini presenti nella lupinella sembrerebbero aver ridotto il numero di protozoi, con conseguente diminuzione della degradazione proteica e quindi delle concentrazioni di ammoniaca e acidi grassi volatili. Come atteso, l'effetto inibitorio è stato comunque limitato dalla presenza del PEG, anche se il risultato non sembra essere così evidente per tutti i parametri analizzati. La diminuzione instabile dei valori durante tutto il periodo di prova potrebbe far pensare ad una sorta di adattamento della popolazione microbica del rumine alla presenza dei fattori anti-nutrizionali; i protozoi e i batteri, infatti, potrebbero attuare dei meccanismi difensivi per superare l'effetto dei tannini.

Probabilmente, per ottenere risultati più chiari occorreva utilizzare una percentuale maggiore di lupinella, ma per problemi tecnici non si è potuta superare la quantità utilizzata. Ulteriori studi si rendono tuttavia necessari per definire in che termini una dieta a base di una leguminosa ricca in tannini, quale la lupinella, può influenzare il cambiamento della popolazione ruminale e dei parametri fermentativi. Tali informazioni saranno utili per trovare un buon equilibrio tra i parametri dell'ambiente ruminale e le performance animali, anche in relazione ad una riduzione dell'impatto ambientale che riguarda le produzioni di metano di derivazione zootecnica.

L'approfondimento delle caratteristiche nutrizionali e di fermentazione del fieno "sano" di lupinella allo scopo di contenere le emissioni di metano nell'atmosfera, risulta oltretutto interessante; resta da stabilire entro quale limite di impiego questi composti, noti fino a poco tempo fa come fattori antinutrizionali, possano avere un effetto benefico sull'attività dei microrganismi ruminali e quindi sulle produzioni animali.

Non bisogna sottovalutare il fatto che le strategie alimentari per la riduzione delle emissioni di metano in zootecnia, vanno viste alla luce di un equilibrio che tiene conto dell'eco-sostenibilità delle produzioni degli alimenti da utilizzare.

Le tecniche *in vitro* sono strumenti utili per lo studio degli ecosistemi microbici ruminali e per la valutazione del valore nutritivo degli alimenti. Tuttavia, per la stima delle emissioni di gas hanno alcune limitazioni, a causa di numerosi fattori che influenzano notevolmente la degradazione e l'attività microbica:

- composizione microbiologica del inoculo (protozoi e funghi non crescono bene *in vitro*);
- non è possibile creare adeguatamente *in vitro* i tre settori del rumine e in particolare i batteri aderenti alla fibra e alla parete ruminale;
- i sistemi *in vitro* sono chiusi e non consentono la fuoriuscita dei prodotti (AGV, gas) o la disponibilità di substrato nuovo;
- la dimensione delle particelle di 1 mm, impiegata negli esperimenti *in vitro* aumenta la superficie per l'attività dei batteri rispetto alla situazione *in vivo*, dove le dimensioni delle particelle dell'alimento sono molto più grandi.

Tuttavia, le tecniche *in vitro*, anche con tutte le limitazioni indicate, permettono di effettuare ricerche su queste importanti tematiche superando gli innumerevoli vincoli della parte *in vivo*, tracci non ultimo per importanza, quello economico. È importante

però la standardizzazione dei protocolli nonché la cautela nell'interpretare i risultati al fine di inserirli nell'alveo delle conoscenze già acquisite.

Nonostante, come più volte detto, la valutazione del metano è attualmente oggetto di numerosi studi scientifici, molti sono gli aspetti ancora da chiarire a causa della notevole complessità in cui avvengono i processi metabolici legati alla sua produzione. Inoltre, i risultati presenti in bibliografia, sono spesso notevolmente variabili e non sempre tra di loro confrontabili, in parte perché ottenuti in condizioni sperimentali diverse o semplicemente perché riferiti con unità di misura differenti. È auspicabile che in futuro si pervenga alla standardizzazione delle tecniche e dei metodi al fine di ottimizzare la ricerca in questa tematica.

CAPITOLO 8.

Riferimenti bibliografici

1. A.S.P.A. Commissione Valutazione Alimenti (1980) Valutazione degli alimenti di interesse zootecnico. Zoo. e Nutr. Anim., 6:19-34.
2. Abaza, M. A., Abou , A. R., 1975. Effect of rumen protozoa on dietary lipid in the sheep. J. Agric. Sci. vol 85, pp. 135.
3. Albercht K.A., Much R.E. (1991). Proteolysis in ensiled forage legumes that vary in tannin concentration. Crop Science. 31: 464-469.
4. Anderson, K. L., Tayne, T.A. and Ward, D.M. (1987). Formation and fate of fermentation products in hot spring cyanobacterial mats. *Applied Environment Microbiology*. 53: 2343-2352
5. Annison, E F e Lewis D (1959) Metabolism in the Rumen. Methuen, London.
6. Armstrong, D.G. Harry J. Biotechnology and the rumen: A mini review (1985) J. Sci. Food Agric., 36:1039-1046.
7. Bannink A., Kogut J., Dijkstra J., Kebreab E., France J., Tamminga S., Van Vuuren A.M. 2006 Estimation of stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. J. Theoret. Biol., 238, 36-51
8. Barry, T.N., Manley, T.R. and Duncan S.J. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. Brithis Journal of Nutrition 55: 123-137.
9. Barry, T.N., Fors, D.A. (1983). The condensed tannin content of vegetative Lotus Pedunculatus, its regulation by fertilizer application, and effect upon protein solubility. J. Sci. Food Agric., 34: 1047-1056.
10. Bauer E., Williams B.A., Voigt C., Mosenthin R., Verstegen M.W.A. (2001). Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. Anim. Sci., 73: 313-322.
11. Beauchemin K.A., McGinn S.M., 2006. Methane emissions from beef cattle : effects of fumaric acid, essential oil and canola oil. Journal of Animal Science 84, 1489-1496
12. Beauchemin K.A., Kreuzer M., O'Mara and McAllister T.A. (2008) Nutritional management for enteric methane abatement : a review. Australian Journal of Experimental Agriculture. 48(2):21-27
13. Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Ben Salem, L., Tisserand J.L. 2000. Deactivation of condensed tannins in Acacia cyanophylla Lindl. foliage by polyethylene glycol in feed blocks. Effect on feed intake, diet digestibility, nitrogen balance, microbial synthesis and growth by sheep. Livestock Prod. Sci., 64: 51-60.
14. Bergen, W. G. and Bates, D. B. (1984). Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. *Journal of Animal Science*. 58: 1465-1483.
15. Berthelot MpE 1859 Repert. de chim. appl. 1, 282-284
16. Birkelo, C. P., D. E. Johnson, and G. M. Ward. 1986. Net energyvalue of ammoniated wheat straw. J. h i m . Sci. 63:2044.
17. Blaxter, K. L. and Wainman, F. W. (1964). The utilization of the energy of different rations by sheep and cattle for maintenace and for fattening. *Journal of Agricultural Science*. 63: 113-128.
18. Blaxter K.L., Clapperton J.L., 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. Br.J.Nutr. 19.511.
19. Blaxter, K. L. 1989. Energy Metabolism in Animals and Man. Cambridge University Press, New York.

19. Blummel M., Orskov E.R. (1993): Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting of food intake in cattle. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, **40**, 109–119.
20. Blümmel, M., Givens, D. I., Moss, A.R. (2005). Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by an *in vitro* gas producere. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124, 379-390.
21. Bonhomme, A. (1990). Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Animal Feed Science and Technology*. **30**: 203-266.
22. Borreani, G., Peiretti, P.G., Tabbacco, E. (2002). Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in spring growth cycle. www.edpsciences.org
23. Burns R. E., 1971. Method for estimation of tannin in grain sorghum. *Agr. J.*, **63**:511-512
24. Calabrò S. (1999). Stima delle caratteristiche fermentative di alimenti per ruminanti mediante la tecnica di produzione cumulativa di gas. Tesi di Dottorato in “Scienze dell’Allevamento Animale” Università degli studi di Napoli Federico II.
25. Calabrò S., Marchiello M., Piccolo V. 2001. *In vitro* fermentation of some cereals and legumes grains. Proc. XIII Congr. Naz. ASPA Firenze (Italy) 153-155.
26. Calabrò S., Williams B.A., Piccolo V., Infascelli F., Tamminga S. (2004) A comparison between buffalo and cow rumen fluids in terms of the *In vitro* fermentation characteristics of three fibrous feedstuffs. *J. Sci. Food and Agric.* **84**:645-652.
27. Calabrò S., Tudisco R., Balestrieri A., Piccolo G., Infascelli F., Cutrignelli M.I. (2009) Fermentation characteristics of different grain legumes cultivars with the *in vitro* gas production technique. *Ital. J. Anim. Sci.* vol. 8 (Suppl. 2), 280-282.
28. Carleton, A.E., C.S. Cooper, C.W. Roath, and J.L. Krall. 1968b. Evaluation of sainfoin for irrigated hay in Montana. p. 44–48. *In* C.S. Cooper and A.E. Carleton (ed.) Sainfoin symposium. Bull. 627. Montana Agric. Exp. Stn., Bozeman, MT.
29. Carulla et al., (2005)
30. Chiquette J, Cheng KJ., Costerton J.W., Milligan L.P., 1988. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using *in vitro* and *in sacco* techniques. *Can J. Anim. Sci.* **68**, 751-760.
31. Cicerone, R.J, and R.S. Oremland, 1988 Biogeochemical aspects of atmospheric methane. GLOBAL BIOGEOCHEMICAL CYCLES, VOL. 2, NO. 4, PAGES 299–327, 1988
32. Colombari, Crovetto, G.M., Borreani G., Tabacco E., Zapparoli G.A. 2005 L’aggiunta di tanniniper migliorare l’insilato di medica, *L’informatore agrario* **39**: 51-57.
33. Crutzen, P. J., Aselmann, I. and Seiler, W. (1986). Methane production by domestic animals, wild ruminants, other herbivorous fauna and humans. *Tellus* . **38B**: 271-284.
34. Curch, D. C. (1973). Digestive Pysiology and Nutritio of Ruminants, Volume I, DigestivePysiology. O&B Books, Corrollis, Oregan, USA. 316 pp.
35. Cutrignelli M.I., Calabrò S., Bovera F., Tudisco R., D’Urso S., Marchiello M., Piccolo V., Infascelli F. (2008) Effects of protein source and energy value of diet on the performance of young Marchigiana bulls: 2. meat quality. Accepted for publication on *Ita. J. of Anim. Sci.*, 3:259-270.
36. Cutrignelli M.I., Piccolo G., Bovera F., Calabrò S., D’Urso S., Tudisco R., Infascelli F. (2008) Effects of protein source and energy value of diet on the performance of young Marchigiana bulls: 1 *Infra vitam* performance and carcass quality. Accepted for publication on *Ita. J. of Anim. Sci.*, 3:271-286.
37. Czerkaswski, J. W., Blaxter, K. L. and Wainman, F. W. (1966a). The metabolism of oleic, linoleic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *British Journal of Nutrition*. **20**: 349-362

38. Czerkawski, J. W. and Breckenridge, G. (1969). Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen microorganism with particular reference to methane production. *British Journal of Nutrition*. 23 : 925-937.
39. Czerkawski, J. W., Harfoot, C. G. and Breckenridge, G. (1972). The relationship between methane production and concentrations of hydrogen in the aqueous and gaseous phases during rumen fermentation in vitro. *Journal of Applied Bacteriology*. 35 : 537-551.
40. Czerkawski J.W. 1986 *An introduction to rumen studies* Pergamon Press, Oxford, U.K.
41. Decandia, M., Sitzia, M., Cabiddu, A., Kababya, D., Molle, G. 2000. The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in goats fed woody species. *Small Rumin. Res.*, 38: 157-164.
42. Dehority, B.A 1969 Pectin-fermenting Bacteria Isolated from the Bovine Rumen. *J. of bacteriology*, July, 189-196
43. Dehority, B.A. 1984 Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl Environ Microbiol*; 48(1): 182-185
44. Demeyer 1981. Rumen Microbe and Digestion of Plant Cell Walls. *Agric. Environ Vol. 6*, no. 2-3, pp. 295-337.
45. Demeyer, D.I. , and C.J Van Nevel 1975 Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control, p.366-382. In I.W. Mc Donald, and A.C.I. Warner (eds) *Digestion and metabolism in the ruminant*. University of New England Publishing Unit, Australia.
46. Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S. (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 313-322.
47. Dijkstra J., Neal HD.St.C., Beever D.E., France J. 1992. Simulation of nutrient digestion, absorption and outflow in the rumen: model description. *J.Nutr.*122,2239-2256
48. Dohane P. H., Schoffield P., Pell A. N. (1997) - Neutral detergent fiber disappearance and gas volatile fatty acid production during the *in vitro* fermentation of six forages. *J. Anim. Sci.*, 75:3342-3352.
49. Dohme, F., Machmuller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M. (1999). The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 187-192.
50. EPA. 1993. Anthropogenic methane emissions in the United States: Estimates for 1990. Report to Congress. EPA 430-R-93-003.
51. Eun, J-S., Fellner, V. Gumpertz, M.L., 2004 Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermenters. *J. Dairy Sci.* 87, 112-121.
52. Fenchel T, Finlay BJ (1995) *Ecology and evolution in anoxic worlds*. Oxford University, Oxford
53. Frame, J., Charlton, J.F.L. and Laidlaw, A.S. (1998). *Temperate Forage Legumes*. Wallingford: CAB International.
54. Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H., Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. of Nut.* 88(6): 587-605.
55. Freudenberg (1922). *Ber. deut8ch. chem. Ges.* 52, 177, 1238.
56. Frumholtz P.P., Newbold C.J., Wallace R.J. (1989) Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *J Agric Sci (Camb)* 113: 169-172.
57. Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R. 2002. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain and its relationship to various indicators of nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 95: 215-226.
58. Getachew, G.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. The *in vitro* gas coupled with ammonia nitrogen measurement for evaluation of nitrogen degradability in low quality

- roughages using incubation medium of different buffering capacity. *J. Sci. Food Agric.* 1998, 77, 87-95.
59. Getachew, G., Robinson, P. H., DePeters, E. J., Taylor, S. J. (2005). Methane production from commercial dairy rations estimated using an in vitro gas technique. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124, 391-402.
 60. Goel, G., Makkar, H.P.S., Becher, K. 2008. Changes in microbial community structure methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fraction from different plant materials. *S. Of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.
 61. Griggs, T.C. and Matches, A.G. (1991). Productivity and consumption of wheatgrasses and wheatgrass-sainfoin mixtures grazed by sheep. *Crop. Science*. 31: : 55 1267-1273.
 62. Groot J.C.J., Cone J.W., William B.A., Debersaque F.M.A. (1996) Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feedstuff. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 64:77-89.
 63. Gruby, D. and Delafond, H. M. O. Recherches sue des animalecules se developant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestines pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *C. R. Ances Acad. Sci., Paris* 1843, 17, 1304-1308
 64. Harper, L. A., O. T. Denhead, andJ . R. Freney. 1993. Micrometeorological determination of methane production by grazing and feedlot cattle. *Proc. Am. Soc. Agron. (Abstr.)* 13.
 65. Hedqvist, H. (2000). Metabolism of soluble proteins by rumen microorganisms and the influence of condensed tannins on nitrogen Solubility and degradation. Thesis.
 66. Hedqvist, H., Murphy, M., Nilsson-Linde, N. (2002) Multi-function grasslands: quality forages, animal products and landscapes. Proceedings of the 19th General Meeting of the European Grassland Federation, La Rochelle, France, 27-30 May 2002
 67. Hegarty, R.S. (1999). Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of agricultural research*. 50: 1321-7.
 68. Hespell, R. B., D. E. Akin & B. A. Dehority (1997). Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In: Mackie, R. I., B. A. White & R. E. Isaacson (eds) *Gastrointestinal Microbiology*, vol. 2. Chapman and Hall, New York, pp. 59-141.
 69. Hess, H.D., Kreuzer, M., D'iaz , T.E., Lascano, C.E., Carulla ,J.E., Soliva, R., Machmüller, A. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentationand methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Fed Science and Tecnology* 109, 79-94.
 70. Hoste, H., Gaillard, L., Le Frileux, Y. (2005). Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats. *Small Ruminant Research*. 59: 265-271.
 71. Hristov, A.N., Ivan M.,Rode L.M, McAllister, T.A. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets *Journal of Animal Science*, Vol 79, Issue 2 515-524
 72. Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. New York: Academic Press
 73. Hungate, R., E.1966. Rumen protozoa. Academic Press ,New York, 91-147.
 74. Hungate, R. E., Smith, W., Bauchop, T. Yu, I and Rabinowitz, J. C.(1970). Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology*. 102 : 389-397
 75. Infascelli F., Cutrignelli M.I., Bovera F., Tudisco R., Zicarelli F., Calabrò S. 2005 Effects of diet polyethylene glycol supplementation on the performances of Cilentana goats grazing woodland and scrubland. *Proc. 11th Seminar of the Sub-Network FAO-CIHEAM on Sheep and Goat Nutrition "Advanced nutrition and feeding strategies to improve sheep and goat production"* Catania (Italy), pp. 52.

76. Innis MA, Gelfand DH. (1990) Optimization of PCRs. In: PCR protocols. A guide to methods and applications. Editors: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. San Diego, CA. Academic Press, Inc, Chapter 1:3-12. INRA *Alimentation des bovins, ovins et caprins* Ed. INRA, 147, rue de l'Université, 75007 Paris, 1988.
77. IPCC. 1992. Intergovernmental panel on climate change. Climate Change 1992. The supplementary report to the IPCC Scientific Assessment. Cambridge University Press, New York.
78. Jarvis GN, Strompl C, Burgess DM, Skillman LC, Moore ER, Joblin KN (2000) Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Curr Microbiol* 40:327-332
79. Joblin KN, Matsui H, Naylor GE, Ushida K (2002) Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*. *Curr Microbiol* 45:46-53
80. Johnson, K.A., Westberg H.H, Michal J.J., Cossalman M.W. 2007 The SF6 Tracer Technique: Methane Measurement From Ruminants in Makkar, H.P.S. and Vercoe P.E. 2007 Measuring Methane Production from ruminants Published by Springer
81. Johnson, D. E., T. M. Hill, G. M. Ward, K. A. Johnson, M. E. Branine, B. R. Carmean, and D. W. Lodman. 1993. Principle factors varying methane emissions from ruminants and other animals. In: M.A.K. Khalil (Ed.). *Atmospheric Methane: Sources, Sinks, and Role in Global Change*. NATO **A D 1** Series Vol 113, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
82. Johnson, K. A., M. T. Huyler, H. H. Westberg, B. K. Lamb, and P. Zimmerman. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF6 tracer technique. *Environ. Sci. & Technol.* 28:359.
83. Johnson K.A., Johnson D.E., 1995 Methane emissions from cattle, *J. Anim. Sci* 73, 2483-2492
84. Jones, G.A., McAllister, T.A, Muir, A.D., Cheng, K.J. 1994. Effect of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 1374-1378
85. Jones, W.T. and Mangan, J.L. (1977). Complex of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J. Sci. Food and Agric.*, 28: 126-136.
86. Jouany, J.P., D.I., Grain, J. (1988). Effect of defaunating the rumen. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, 21: 229-265.
87. Kallenbach, R. L., Matches, A.G. and Mahan, J.R. (1996). Sainfoin regrowth declines as metabolic rate increase with temperature. *Crop Science*. 36: 91-97.
88. Kamra, D. N., Patra A.K., Chatterjee P.N. Chatterjee, Ravindra Kumar, Neeta Agarwal and Chaudhary L.C. (2008) Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of rumen of buffalo: a brief overview. *Australian J. Exp. Agriculture*, 48: 175-178
89. Kamra, D., 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, vol.89, no.1, 10.
90. Koupai-Abyazani, M. R., McCallum, J., Muir, A. D., Bohm, B. A., Towers, G. H. N. and Gruber, M. Y. (1993). Developmental changes in the composition of proanthocyanidins from leaves of sainfoin (*onobrychis viciifolia* scop.) As determined by HPLC analysis. *J. Agric Food Chem.* 41: 1066-1070
91. Krumholz, L.R., Forsberg, C. W. and Veira, D.M. (1983). Association of methanogenic with rumen protozoa. *Canadian Journal of Microbiology*. 19: 676
92. Lange, M., Westermann P., Kiær Ahring B. 1995 Archaea in protozoa and metazoa. *Appl Microbiol Biotechnol* (2005) 66: 465-474
93. Lee H.J., Lee S.C., Kim J.D., Oh Y.G., Kim B.K., Kim C.W., Kim K.J. 2003. Methane Production Potential of Feed Ingredients as Measured by In Vitro Gas Test. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* , Vol. 16 No. 8 : 1143-1150.

94. Lees, G.L., Gruber, M.Y., Suttill, N.H. (1995). Condensed tannins in sainfoin. II: occurrence and changes during leaf development. *Canadian J. of Botany* 73: 1010, 1540-1547.
95. Liang, J. B., F. Terada, and I. Hamaguchi. 1989. Efficacy of using the face mask technique for the estimation of daily heat production of cattle. In: Y. Van Der Honing and W. H. Close (Ed.). *Energy Metabolism of Farm Animals*. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
96. Licitra G., Schadt I., Carpino S., Campisi G., Azzaro G., Petriglieri R., Scollo C., Lanza M., Fasone V., Van Soest P.J., 2001. *Manuale degli alimenti e dei foraggi in Sicilia*. Consorzio ricerca filiera lattiero-casearia di Ragusa.
97. Lopez, S. and Newbold C.J. 2007 *Analysis of Methane in Makkar, H.P.S. and Vercoe P.E. 2007 Measuring Methane Production from ruminants* Published by Springer
98. Lovett, D. K., Bortolozzo, A. Conaghan, P., O'Kiely, P. and O'Mara, F. P. (2004). *Blackwell Publishing Ltd. Grass and Forage Science*. 59: 227-232.
99. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protei measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
100. Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J. and Riley, P. W. (2002). *Microbiology*. 148: 3521-3530.
101. Maas P.J., (1987) testing the calculation of the nutritive value according to the NEL system of fresh grass with an high N content. Msc thesis Wageningen Agricultural University. 24 p: In Tamminga S., Bannink A., Dijkstra J., Zom R., Feeding strategies to reduce methane loss in cattle, Animal Science Group WU, Report 34, 2007
102. Machmuller A, Kreuzer M. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Canadian Journal Animal Science* 79, 65-72
103. Makkar, H.P.S. and Vercoe P.E. 2007 *Measuring Methane Production from ruminants* Published by Springer
104. Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Res.*
105. Makkar, H. P. S., M. Blümmel, and K. Becker. 1995. In vitro effects and interactions of tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 69:481-493.
106. Makkar, H. P. S., M. Blümmel, and K. Becker. 1995b. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *British J. of Nutrition*, 73: 897-913.
107. Monteny G.J., Bannink A., Chadwick D., 2005, Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 112 163-170.
108. Marais, J.P.J., Muller-Harvey, I., Brandt, E. V., Ferreira, A. (2000). Polyphenols, condensed tannins, and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48: 344-3447.
109. Mariani, A. P. Podestà A. (1996) *Biochimica e biotecnologie del rumine*. Piccin
110. Martillotti, F., Antongiovanni M., Rizzi L., Santi E., Bittante G. (1987) *Metodi ed analisi per la valutazione degli alimenti d'impiego zootecnico Quad. metod. n.8, CNR (IPRA), Roma*.
111. Martin, S. A. and Macy, J.M. (1985). Effect of monensin pyromellitic diimide and 2-bromoethanesulphonic acid on rumen fermentation in vitro. *Journal of Animal Science*. 60: 544-550
112. Martini A., G. Lorenzini, C. Liotti, S. Squillani, M. Casini, G. Betti, F. Riccio, A. Giorgetti (2005) Utilizzazione di proteine alternative alla soia nell'alimentazione di frisone biologiche, *British Food J.*, vol. 104, n°8, 654-669.

113. McAllister T.A., Newbold C.J., 2008, Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis, *Australian Journal Of Experimental Agriculture*, 48, 7-13.
114. McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh J. F. D., Morgan C.A. 2002. *Animal nutrition* Prentice-Hall.
115. McLean, J.A. and Tobin, G. 1987. *Animal and Human Calorimetry*. Cambridge University Press, New York.
116. McSweeney, C. S., Palmer, B., Kennedy, P. M., and D. O. Krause. 1998. Effect of calliandra tannins on rumen microbial function. *Anim. Prod. Aust.* 22: 289.
117. McSweeney, C. S., Palmer, B., Bunch, R. and Krause, D.O. (1999). Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3075-3083.
118. McSweeney, C.S., Palmer, B., Bunch, R. and Krause, D. O. (2001). Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 78-88
119. Menke K. H., Steingass H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.*, 28: 7-55.
120. Miller, T.L. 1991 Biogenic Sources of Methane. In Rogers, J.E. and Withman W.B: (eds.). *microbial Production and Consumption of GHGs: Methane, Nitrogen Oxides, and Halomethanes*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 175-187.
121. Miller, T.L. 1995. Ecology of methane production and hydrogen sink in the rumen. *Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction* ed. Engelhardt, W., Leonhard-Marek, S., Breves, G. and Giesecke, D. 317-321.
122. Min, B.R., Hart S.P. , 2002 Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* 81, 102-109.
123. Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., McNabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed science and Technology*. 106: 3-19.
124. Mitsunori Tokura, Irbis Chagan, Kazunari Ushida and Yoichi Kojima. Phylogenetic Study of Methanogens Associated with Rumen Ciliates *Curr Microbiol.* 39, 123-128.
125. Moe, P. W. and Tyrrell, H. F. (1979). Methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 62 : 1583-1586.
126. Molan, A.L., Attwood, G.T., Min, B.R., McNabb, W.C. (2001). The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria in vitro and their possible mode of action. *Candida Journal of Microbiology*. 47: 626-633.
127. Monforte-Briceño, G., Sandoval-Castro, C.A, Ramírez-Avilés L., Capetillo Leal C. 2005 Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to in vitro gas production. *Animal Feed Science and Technology*, Volumes 123-124, Part 1, 30 , Pages 313-327.
128. Moomaw, C. R. and Hungate, R. E. (1963). Ethanol conversion in the rumen. *Journal Bacteriology*, 85, 721-722.
129. Morvan B, Bonnemoy F, Fonty G, Gouet P (1996) Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Curr Microbiol* 32:129–133
130. Moss A.R. , 1993 Methane: global warming and production by animals , Canterbury: Chalcombe
131. Moss, A.R., Jouany, J.P. and Newbold, C.J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49: 231-253.
132. Murray, R.M., Bryant, A.M. and Leng, R.A. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*. 36(1): 1-14.

133. Newbold, C.J., Lassalas, B. and Jouany J.P. 1995. the importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production. Letters in Applied Microbiology. 21 (4): 230-234.
134. Newbold , C.J., Ushida, K., Morvan, B., Fonty G. and Jouany J.P. 1996. the role of ciliate protozoa in the lysis of methanogenic archea in rumen fluid. Letters of applied microbiology. 23: 421-425.
135. Newbold, C.J., El Hassan SM, Wang J, Ortega M.E., Wallace R.J. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. The british Journal of Nutrition 78, 237-249
136. Odenyo A.A., Osuji P.O., Reed J.D., Smith A.H., Macie R.I., McSweeney C.S., Hanson J. (2003) *Acacia angustissima*: Its anti-nutrients constituents, toxicity and possible mechanisms to alleviate the toxicity – a short review. Agroforestry Systems, 59: 141–147.
137. Olivetti A., Acciaioli, L. Pianaccioli, E. Della Nave. (2007) Il favino (*Vicia faba minor*) e il pisello proteico (*Pisum sativum*) in sostituzione alla soia estrusa. Prove di alimentazione di vacche da latte. ARSIA, Toscana.
138. Onori M & Tommasoni C. (1986). Le piante foraggere Ed. Agricole.
139. Pacelli C., Sabia E., Girolami A. (2007) Effetto della somministrazione di due differenti fonti proteiche sulle performance produttive e sul profilo metabolico di vitelloni podolici allevati secondo metodo biologico, 3° Workshop GRAB-IT, Roma, 22 Maggio 2007.
140. Palmer, B., McSweeney, C.S., 2000. Tannins in *Calliandra calothyrsus* effect of polyethylen glycol (PEG) and evaluation of 19 accessions. In: Brooker, J.D. (Ed.), Tannins in Livestock and Human Nutrition. ACIAR Proceedings No. 92: 36-39.
141. Parker, R. J., and B. R. Moss. 1981. Nutritional value of sainfoin hay compared with alfalfa hay. J. of Dairy Sci. 64:206-210
142. Patra, A.K, Kamra, D.N. and Argawal, N. (2005). Effect of plant extract in *in vitro* methanogenesis enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. Animal Feed Science and Technology. 128: 276-291.
143. Pell, A. N. and Schofield, P. (1992). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J Dairy Sci.* 76, 1063-1073.
144. Piccioni M. (1989) Dizionario degli alimenti per il bestiame. Con la collaborazione di D. Cevolani-N. Rizzitelli Ed. Agricole.
145. Pressman, B. C. (1976). Biological applications of ionophores. *Annual Reviews of Biochemistry.* 45 : 501-530.
146. Price M. L., Van Scoyoc S., Butler L. G.. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem., 26 (5): 1214-1218.
147. Prins, R. A. (1978). Nutritional impact of intestinal drug-microbe interactions. In: *Nutrition and Drug Interrelationships*. Academic Press, New York. 190: 50-52.
148. Puchala, R., Min, B.R., Goetsch, A.L., Sahlu, T. (2005). The effect of a condensed tannin containing forage on methane emission by goats. Journal of Animal Science . 83: 182-186.
149. R. S. Hegarty Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa
150. Ranilla et al. 2003 Effect of time after defaunation on methane production *in vitro*.
151. Reed, J.D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. Journal of Animal Science. 73:1516-1528.
152. Riedl et al. (2007). *rif sulla metodica dei tannini*
153. Rossi F., Vecchia P., Masoero F. 2001. Estimate of methane production from rumen fermentation. Nutrient Cycling in Agroecosystems 60: 89–92, 2001.
154. Roth, S., Steingass, H., Drochner, W. (2001). Wirkungen von tanninextrakten auf die parameter der pansenfermentation *in vitro*. In proceedings of the 10th conference on nutrition of domestic animals Zdravec-erjavec days, Radenci, Slovakia. P. 64-70.

155. Sandoval Castro, C.A. H. Magaña Sevilla, C. Capetillo Leal, F.D. DeB Hovell 2003 Proc. 6th Inter. Symp. on "The Nutrition of herbivores" Merida, Yucatan (Mexico) In: Tropical and subtropical agro-ecosystems. 3(1-3):179-182.
156. Santra, A., Kamra D.N., Pathak, N.N. and Khan, M.Y. 1994. Effect of protozoa on the loss of Energy in Murrah buffalo (*Bubalus bubalus*) calves, Buffalo J., 10:185-187.
157. Santra, A., Karim, S.A., Mishra, S., Chaturvedi, O.H., Prasad, R. 1995. Rumen ciliate protozoa and fibre utilization in sheep and goats. Elsevier Science B.V.
158. SAS\STAT (2000). User's Guid (Release 6.03). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
159. Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins, Phytochemistry, 30, 12, 3875-3883.
160. Schwartz, H. M. and Gilchrist, F. M. C. (1975). Microbial interactions with the diet and the host animal. In : *Digestion and Metabolism in the Ruminant* (Editors I W McDonadl A C I Waener). New England Publishing Unit, Armidale, Australia, 165-179.
161. Sconhusen, U., Zitnan, R., Kuttla, S., Jentsch, W., Voigt, J. 2003. Effects of protozoa on methane production in rumen of calves around time of weaning. Arch.Anin.Nutr.57, 279-295.
162. Searle 1984. Determination of ammonium in seawater based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPP)
163. Sharp, R., Ziemer, C.J., Stern, M.D., Stahl, D.A. (1998). Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. FEMS Microbiolial Ecology.26: 71-78.
164. Shimizu, M., Kinoshita, M. Fujita, J. and Imai, S. Rumen ciliate protozoa fauna and composition of Zebu cattle, *Bos indicus* and water buffalo, *Bubalus bubalis* in Philippines. Bull Nippon Vet. Zootech. Coll. 1983, 32, 83-88.
165. Silanikove, N., Gilboa, N., Nitsan, Z. 1997. Interactions among tannins, supplementation and poly ethylene glycol in goats fed oak leaves: effects on digestion and feed intake. Anim. Sci., 64: 479-483.
166. Sotohy SA, Sayed AN, Ahmed MM (1997) Effect of tannin-rich plant *Acacia nilotica* on some nutritional and bacteriological parameters in goats. Dtsch Tierarztl Wochenschr 104:432-435
167. Stienezen, M.; Waghorn, G. C.; Douglas, G. B. Digestibility and effects of condensed tannins on digestion of sulla (*Hedysarum coronarium*) when fed to sheep. N. Z. J. Agric.Res. 1996, 39, 215-221
168. Stumm, C.K., Gijzen, H.J., Vogels G.D. 1980. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. British J. Of. Nutrition, 47, 49-59.
169. SUPELCO, 1995. Bulletin 786E: Column selection for gas and light hydrocarbon analysis by packed column GC.
<https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects> Accessed 17 March 2004
170. Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T., Sivakuram, S. (2005). Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effect of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124, 403-419.
171. Theodorou M. K., Williams B.A., Dhanoa M.S., Mcallan A.B., France J. (1994) A simple Gas Production Method Using a Pressure Transducer to Determining the Fermentation Kinetics of Ruminants Feeds. Ciencia e Invest. Agr.20:332-344.
172. Thomson , D. J., (1982). Legume for today and tomorrow. Science of Grassland. 1982 p.25
173. Thomson, F. and Lamming, G. E. (1972). The flow of digesta dry matter and starch to the duodenum in sheep given rations containing straw of varying particle size. *British Journal of Geophysical Research*. 91 : 10853-10864. Treutter, D., 1994: J. Of Chromatog. 667:290-297

174. Ushida K., Newbold C.J., Jouany J.P. 1997. Interspecies hydrogen transfer between the rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum* and *Methanosarcina barkeri*. *Journal of general and applied microbiology*. 43, 129-131.
175. Van Soest P. J., Robertson . B., Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition *J. Dairy Sci.*, 74:3583-3595.
176. Voegels, G.D., Hoppe W.F., Stumm, C.K. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliate. *Appl Environ Microbiol* 1980, 40:608-612.
177. Waghorn, G. C.; Shelton, I. D.; McNabb, W. C.; McCutcheon, S. N. Effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. *J.Agric. Sci. Cambridge* 1994, 123, 109-119.
178. Waghorn, G.C. and McNabb, W.C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 383-392.
179. Waghorn, G.C., Tavendale, M.H., Woodfield, D.R. (2002). Methanogenesis from forages fed to New Zeland ruminants. *Proceedings of the new Zeland Grassland association*. 64: 167-171.
180. Wang, Y.X., Mc Allister, T.A., Newbold, C.J., Cheeke, P.R., Cheng, K.J. 1997. Effects of yucca extract on fermentation and degradation of saponins in the Rusitec. *Proc. West Sect. Amm Soc. Anim.Sci.* 48, 149-152.
181. Wang X., Warkentin, Briggs C. J., Ooman B. d., 1998. Total phenolics and condensed tannins in field pea (*Pisum sativum* L) and grass pea (*Lathyrus sativum* L). *Euphytica*, 101: 97-102.
182. Wang Y., Douglas G.B., Waghorn G.B., Barry T.N., Foote A.G., Purchas R.W. (2000). Effect of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *Lotus corniculatus* and Lucerne (*Medicago sativa*), *J. Agric. Sci. (Camb.)* 126: 87-98.
183. Whitelaw, F.G., Eadie, J. M., Bruce, L. A., Shand, W. G., 1984 Defaunation of the rumen of cattle fed a barley diet decreased methane production by approximately one- half *British Journal of Nutrition* 52, 261-275
184. Williams A.G. Coleman G.S. 1988. The rumen protozoa. In: *The rumen microbial ecosystem* (Ed. P.N. Hobson), pp. 77-128. New York: Elsevier Applied Science
185. WMO, World Meteorological Organization. 2008 *The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Using Global Observations through 2007*. Greenhouse Gas Bulletin, N.4.
186. Wolin, M.J., and T.L. Miller 1983. Interactions of microbial population in cellulose fermentation. *Fed.Proc.* 42:109-113.
187. Woodward, S.L., Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J., Lassey, K. R. (2001). Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emission from ruminants. *Proc. N.Z. Anim. Prod.* 61: 2326.